

Die Luteinzellkultur als Modell
zur Untersuchung der Progesteronsekretion
von Corpora lutea und
Corpus luteum-„Zysten“ beim Rind

Angelika Stock

Diss
München
1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554004_0031

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Lehrstuhl: Professor Dr. W. Leidl

Die Luteinzellkultur als Modell zur Untersuchung
der Progesteronsekretion von Corpora lutea und
Corpus luteum-"Zysten" beim Rind

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Angelika Stock
aus
Rudelsdorf/Baden Württemberg

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. W. Leidl

Korreferent: Prof. Dr. I. Rüsse

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen Eltern
und Geschwistern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	2
2.1. Corpora lutea mit Hohlraumbildung	2
2.1.1. Vorkommen und Bedeutung	4
2.1.2. Veränderungen im Laufe des Zyklus	7
2.1.2.1. Morphologie	7
2.1.2.2. Progesterongehalt im Corpus luteum-Gewebe	12
2.1.2.3. Progesteronkonzentration im peripheren Blut	14
2.2. Methoden zur Untersuchung von Luteingewebe in vitro	16
2.2.1. Inkubation von Gewebestücken	16
2.2.2. Inkubation von Zellsuspensionen	18
2.2.3. Zellkultur	21
2.3. Progesteronsynthese bzw. -sekretion von Luteingewebe in vitro	25
2.3.1. Einfluß des Entwicklungsstadiums der Corpora lutea	27
2.3.2. Einfluß zugefügter Hormone	29
2.3.2.1. Hormone der Hypophyse	29
2.3.2.2. Steroidhormone des Ovars	35
2.3.2.3. Prostaglandine	37
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	38
3.1. Material	38
3.2. Methoden	40
3.2.1. Gewinnung und Verarbeitung der Corpora lutea	40
3.2.2. Beurteilung des Funktionsstadiums	40
3.2.2.1. Makroskopische Untersuchung	40
3.2.2.2. Progesteronkonzentration im Blutserum	42

	Seite
3.2.3.	Nährmedien 42
3.2.4.	Dispergierung des Luteingewebes 43
3.2.4.1.	Voruntersuchungen 44
3.2.4.2.	Standardisierung des Verfahrens 46
3.2.5.	Zählung und Vitalitätsbestimmung der Luteinzellen 48
3.2.6.	Hormonelle Beeinflussung der Progesteronsekretion 49
3.2.6.1.	Voruntersuchungen mit LH bzw. hCG 49
3.2.6.1.1.	Vorinkubations- und Inkubationsdauer 50
3.2.6.1.2.	Serumhaltiges und serumfreies Medium 54
3.2.6.2.	Standardisierung des Verfahrens 57
3.2.6.2.1.	Zellaussaat und Kulturbedingungen 57
3.2.6.2.2.	Zugabe von Hormonen 60
3.2.7.	Entnahme und Aufbewahrung der Kulturmedien 62
3.2.8.	Progesteronbestimmung im Kulturmedium 62
3.2.9.	Progesteronbestimmung im Blutserum 65
3.2.10.	Statistik 67
3.3.	Untersuchungen über die Progesteronsekretion von Corpora lutea mit und ohne Hohlraumbildung 68
3.3.1.	Anzüchtbarkeit der dispergierten Luteinzellen 68
3.3.2.	Einfluß der Hohlraumbildung auf die Progesteronsekretion 71
3.3.2.1.	Basale Progesteronsekretion 71
3.3.2.2.	Hormonell induzierte Progesteronsekretion 75
3.3.2.2.1.	Corpora lutea periodica der späten Anbildungsphase und der Blütephase 75
3.3.2.2.2.	Vergleich zwischen der hormonell induzierten Progesteronsekretion von Corpora lutea der Blütephase mit Hohlraumbildung und Corpora lutea graviditatis 86

III

Seite

3.3.3.	Beziehung zwischen der Menge des Hohl- rauminhaltes und der basalen Progesteron- sekretion	90
3.3.4.	Beziehung zwischen der basalen Progeste- ronsekretion der Luteinzellkulturen und der Progesteronkonzentration im Blutserum	92
4.	DISKUSSION	94
5.	ZUSAMMENFASSUNG	109
6.	SUMMARY "Luteal cell culture as a model for examining progesterone secretion of corpora lutea and "cystic" corpora lutea in cows"	111
7.	LITERATURVERZEICHNIS	113

Lebenslauf

1. EINLEITUNG

Corpora lutea mit Hohlraumbildung kommen zwar beim Rind sehr häufig vor, über ihre Bedeutung ist man sich jedoch nicht im klaren. Die bisher publizierten Arbeiten über derartige "Gelbkörper-Zysten" liefern widersprüchliche Ergebnisse. Einerseits sollen sie sich funktionell vom kompakten Gelbkörper nicht wesentlich unterscheiden, andererseits werden sie als Sterilitätsfaktor in Betracht gezogen, vor allem, weil sie nur äußerst selten bei trächtigen Tieren festzustellen sind. Zur Untersuchung der endokrinen Aktivität solcher Gelbkörper wurden bisher vorwiegend Progesteronbestimmungen im Luteingewebe durchgeführt, während über ihre Sekretionsleistung, die den eigentlichen Funktionszustand charakterisiert, bis jetzt keine Angaben vorliegen. Die Aufgabe dieser Arbeit bestand deshalb darin, die Progesteronsekretion von Corpora lutea mit Hohlraumbildung im Vergleich zu kompakten Corpora lutea periodica bzw. Corpora lutea graviditatis zu überprüfen. Durch die Kultivierung von Luteinzellen wurde ein In vitro-Modell entwickelt, das Aussagen zur Progesteronsekretion und deren Stimulierbarkeit durch verschiedene Hormone erlaubt.

2. LITERATUR

2.1. Corpora lutea mit Hohlraumbildung

Bereits Anfang dieses Jahrhunderts war bekannt, daß Corpora lutea des Rindes einen Hohlraum enthalten können (KRUPSKI 1917, WILLIAMS 1921, McNUTT 1924, ELDER 1925, HAMMOND 1927). Jahre später wurde erneut darauf hingewiesen, daß am Ovar des Rindes Gelbkörper auftreten, in denen sich nach Aufschneiden des Organs ein flüssigkeitsgefülltes Lumen zeigt (ASDELL et al. 1949).

In den zahlreichen, seither publizierten Arbeiten findet man unterschiedliche Bezeichnungen für Gelbkörper mit einer Hohlraumbildung. Die meisten Autoren sprechen von der sogenannten Gelbkörperzyste (CONRADI 1943, EHRLICH 1950, KOLLMER 1953, EMRICH 1958, JORDAN 1969, DIETER 1969, GRUNERT 1969, THEISSEN 1970, HORSTMANN 1971, BOROWSKI 1972, CUBICK 1972, KESSANK 1977, HORNIG 1978). Andere wiederum verwenden diesen Begriff nicht, da er ihrer Meinung nach eine pathologische Bedeutung unterstellt. Sie versuchen diese Schwierigkeit zu umgehen, indem sie Corpora lutea mit Hohlraumbildung "zystöse Gelbkörper" nennen (HORSTMANN und SCHWARZ 1973, FLOEHR 1974, GRUNERT 1982). Aus demselben Grund verzichtet OKUDA (1982) völlig auf eine spezielle Nomenklatur und verwendet die Bezeichnung "Corpora lutea mit Hohlraumbildung".

In der angloamerikanischen Literatur sind die Bezeichnungen "luteal cysts" oder "cystic corpora lutea" gebräuchlich. Vor allem in älteren Arbeiten sind damit aber auch luteinisierte Follikelzysten gemeint, die ohne vorherige Ovulation entstanden sind (ASDELL et al. 1949, BENESCH und WRIGHT 1950, ROBERTS 1956, McENTEE 1958, WILLIAMS 1964).

Derzeit ist man aber überwiegend der Meinung, daß Corpus luteum-Zysten bzw. zystöse Gelbkörper aus gesprungenen Follikeln hervorgehen (DAWSON 1964, HANSEL 1964, MORROW et al. 1966, GRUNERT 1982). Während beim kompakten Corpus luteum der zunächst "physiologische" Hohlraum bis zum ca. 4./5. Zyklustag vollständig mit Luteingewebe ausgefüllt wird, bleibt bei einer "Zystenbildung" weiterhin ein Hohlraum bestehen, der sich vom übrigen Luteingewebe bindegewebig abgrenzt und meist mit Flüssigkeit gefüllt ist. Für die Corpus luteum-Zyste ist infolgedessen eine für den Gelbkörper typische knopfartige Erhebung an der Oberfläche kennzeichnend, die den Follikel-Lutein-Zysten fehlt, da sie durch Luteinisierung nicht gesprungener Follikel entstehen (GRUNERT 1969).

Ferner wird für die Bezeichnung Gelbkörperzyste bzw. zystöser Gelbkörper ein bestimmtes Mindestmaß für den größten Durchmesser des mehr oder weniger ovoïden Hohlraumes vorausgesetzt. So soll dieses nach FRIEBE (1970) 1,5 cm betragen, während andere Autoren Mindestmaße von 1,0 cm (DAWSON 1959, MORROW et al. 1976, ROINE 1977, GRUNERT 1982) bzw. 0,7 cm (McENTEE 1958, GREENSTEIN 1960,

HANSEL 1964, RESENDE et al. 1972, OKUDA 1982) angeben. DIETER (1969) bezeichnet hingegen alle Corpora lutea mit Hohlraumbildung als Corpus luteum-Zysten.

2.1.1. Vorkommen und Bedeutung

Zum Vorkommen von Corpora lutea mit Hohlraumbildung gibt es zahlreiche Untersuchungen. Die meisten basieren auf Schlachthofmaterial, in dem Corpus luteum-Zysten relativ häufig vertreten zu sein scheinen. McENTEE (1958) fand auf diese Weise 2 1/2 mal mehr Gelbkörperzysten als Follikelzysten. Sein beeindruckendes Ergebnis war zwar für viele andere Anlaß, sich mit der Corpus luteum-Zyste zu beschäftigen, doch umfassen seine damaligen Untersuchungen, im Unterschied zu den anschließend erwähnten, auch Gebilde, die nach neuerer Definition als Follikel-Lutein-Zysten anzusprechen sind. In England beobachteten AL-DAHASH und DAVID (1977) bei 16,5 % der Schlachtoorgane Gelbkörperzysten. Auch in Deutschland wurde in den letzten Jahren anhand von Befunden an Schlachtrindern auf ein häufiges Vorkommen von Corpus luteum-Zysten hingewiesen. Während man früher relativ wenig Corpus luteum-Zysten feststellte (KOLLMER 1953, ERNST 1956, EMRICH 1958), liegen in neuerer Zeit die Angaben über ihre Häufigkeit zwischen 10 und 21,2 % (BOROWSKI 1972, CUBICK 1972, OKUDA 1982).

Es ist sehr schwierig, die stark divergierenden Angaben der einzelnen Autoren zu vergleichen, da sowohl die Menge des untersuchten Materials als auch die Definition der Corpus luteum-Zyste bezüglich ihrer minimalen Hohlraumgröße nicht einheitlich sind.

In wieweit die Rasse eine Rolle spielt, ist nicht genau bekannt. Relativ selten sollen Corpus luteum-Zysten beim finnischen Ayrshirerind (ROINE 1977) bzw. bei spanischen Zeburindern (RESENDE et al. 1972) vorkommen. Die letztgenannten Autoren führen das häufige Auftreten von Corpus luteum-Zysten in anderen Ländern darauf zurück, daß dort vorwiegend Milchrassen untersucht wurden. Darüberhinaus scheint es jahreszeitlich bedingte Schwankungen zu geben. So sollen von August bis Januar mehr Corpus luteum-Zysten zu finden sein als von Februar bis März (MORROW et al. 1966, BOROWSKI 1972).

Obwohl Untersuchungen an exzentrierten Organen ein häufiges Vorkommen der Corpus luteum-Zyste dokumentieren, werden sie im Rahmen klinischer Untersuchungen nur sehr selten erwähnt. Dies dürfte mit der Schwierigkeit der klinischen Diagnose zusammenhängen. Bei einem Vergleich zwischen Befunden intra vitam und post mortem zeigte sich, daß Corpus luteum-Zysten zum Teil klinisch nicht erfaßt, oder umgekehrt klinisch diagnostizierte Corpus luteum-Zysten post mortem nicht bestätigt werden konnten (DAWSON 1959, 1964, 1975, MORROW et al. 1966, JORDAN 1969, HORNIG 1978).

Aussagen zur klinischen Bedeutung von Corpus luteum-Zysten sind selten. Sie sind nur dadurch zu gewinnen, daß man Tiere, deren Zyklusgeschehen bekannt ist, post mortem untersucht und bei Vorliegen von Corpus luteum-Zysten die entsprechenden klinischen Auswirkungen rekonstruiert.

Derartige Rückschlüsse lieferten bisher nur vage Anhaltspunkte für die Bedeutung von Corpus luteum-Zysten. Einerseits sollen sie die Zykluslänge nicht beeinträchtigen, jedoch bringt man fehlende oder abnorme Brunstsymptome mit ihnen in Zusammenhang (McENTEE 1958). Andererseits sollen sie zu einer Zyklusverlängerung führen (DAWSON 1959). Das häufige Vorkommen von Corpus luteum-Zysten bei Tieren, die wegen Fruchtbarkeitsstörungen abgingen (DAWSON 1959, 1964, MORROW et al. 1966), bietet einen weiteren Hinweis dafür, daß sie möglicherweise das Zyklusgeschehen der Tiere ungünstig beeinflussen. Ob sie in diesen Fällen den primären Sterilitätsfaktor darstellten, bleibt jedoch unklar, da zum Teil gleichzeitig Entzündungen des Ovars und des Eileiters vorlagen (DAWSON 1959, 1964).

Eindeutige Aussagen zur klinischen Bedeutung von Corpus luteum-Zysten findet man in Arbeiten japanischer Autoren, die in der Corpus luteum-Zyste eine Sterilitätsursache sehen (KANEDA et al. 1980). Durch Sprengen der Corpus luteum-Zyste oder Aspiration des flüssigen Inhaltes konnten sie die Konzeptionsrate der Tiere wesentlich verbessern.

Wie bereits erwähnt, wird die Corpus luteum-Zyste mit Infertilität in Zusammenhang gebracht, weil sie bei trächtigen Tieren selten vorkommt. In einigen Fällen wurden bei Tieren mit Corpus luteum-Zysten Eihautreste von Früchten, die im frühembryonalen Stadium abgestorben waren, gefunden (BOROWSKI 1972). Auch endokrinologische Untersuchungen sprechen dafür, daß Corpus luteum-Zysten Ursache eines frühembryonalen Fruchttodes sein können (GRUNERT 1969). Andere Autoren wiederum nehmen an, daß auch Corpus luteum-Zysten eine Gravidität aufrechterhalten können, der Hohlraum mit fortschreitender Gravidität verschwindet und mit Bindegewebe ausgefüllt wird (MORROW et al. 1966).

Obwohl es also zahlreiche Hinweise für eine klinisch-pathologische Bedeutung der Corpus luteum-Zyste gibt, ist eine solche letztendlich nicht bewiesen.

2.1.2. Veränderungen im Laufe des Zyklus

2.1.2.1. Morphologie

Viele Parameter, die zur Charakterisierung zyklusbedingter, makroskopischer Veränderungen am kompakten Gelbkörper dienen, werden auch für die morphologische Kennzeichnung zystöser Gelbkörper verwendet. Unter anderem werden Größe, Form, Konsistenz, die Ausbildung der typischen Pilzform sowie der Übergang zum restlichen Ovargewebe erfaßt. Hinzu kommt bei den Corpus luteum-Zysten die

Beschreibung des Hohlraumes, d.h. seiner Größe, Gestalt, bindegewebigen Auskleidung sowie der Menge und Beschaffenheit seines Inhaltes.

Die Größe des Hohlraumes scheint unabhängig vom Zyklustag in einem weiten Bereich zu schwanken (ASDELL et al. 1949, GREENSTEIN 1960, DAWSON 1964, FLOEHR 1974). Das konnte vor allem deutlich gezeigt werden, als man Tiere mit bekanntem Zyklusgeschehen post mortem untersuchte. Bei insgesamt 23 Tieren mit Corpus luteum-Zyste, die am 6., 12. oder 18. Zyklustag geschlachtet wurden, ermittelte GREENSTEIN (1960) maximale Hohlraumdurchmesser, die stets unter 1,0 cm lagen. Später, im Rahmen ähnlicher Untersuchungen, konnte er dagegen Maße von 0,9 - 1,6 cm am 6. bzw. 1,2 - 1,5 cm am 18. Zyklustag feststellen. DAWSON (1964) fand bei Corpus luteum-Zysten am 6. Zyklustag einen maximalen Hohlraumdurchmesser von etwa 0,8 cm.

Die meisten Angaben zur Hohlraumgröße - dazu gehören auch die folgenden - liegen jedoch ohne exakte Kenntnis des Zyklusstadiums vor. DAWSON (1964) registrierte einen Durchschnittswert von 1,6 cm für den maximalen Hohlraumdurchmesser. Es wurde aber auch versucht, das Ausmaß des Hohlraumes durch Bestimmung von Längs- und Querdurchmesser bzw. durch das Volumen seines flüssigen Inhaltes zu charakterisieren. Bei 42 Corpus luteum-Zysten konnten dafür Maximalwerte von 2,9 x 3,8 cm bzw. 11,0 ml und Minimalwerte von 0,1 x 0,2 cm bzw. 0,4 ml ermittelt werden (GRUNERT 1969). DIETER

(1969) ordnete die Corpus luteum-Zysten nur anhand der Menge ihres flüssigen Inhaltes in drei Gruppen ein: Erbsengroße Zysten mit 0,1 ml, haselnußgroße Zysten mit 0,5 ml und größere (walnußgroße) Zysten.

Die übrigen zyklusbedingten makroskopischen Veränderungen scheinen nicht stark von denen, die für den kompakten Gelbkörper beschrieben sind (McNUTT 1924, ERNST 1956, ÜBERSCHÄR 1961), abzuweichen. MORROW et al. (1966) bezeichnen die Corpus luteum-Zysten als weiche, fluktuierende Gebilde, welche meistens größer als "normale" Gelbkörper sind, während nach CUBICK (1972) nur wenige extrem große Corpus luteum-Zysten den maximalen Umfang kompakter Gelbkörper übertreffen. Die Pilzbildung variiert bei Corpus luteum-Zysten noch mehr als bei kompakten Gelbkörpern. Bei großen Zysten verläuft sie flach und breit, bei kleineren hebt sie sich stärker vom Ovar ab. Vor allem Corpus luteum-Zysten der Rückbildungsphase zeigen eine pralle Form und einen relativ kleinen Gelbkörperknopf. Wie CUBICK (1972) betont auch BOROWSKI (1972), daß bei Corpus luteum-Zysten Knopfbildungen nicht so häufig zu finden sind wie beim kompakten Corpus luteum; bei Hohlräumen mit einem Durchmesser von mehr als 1,0 cm werden sie nur noch in rund 50 % der Fälle festgestellt.

Die Farbe von Corpus luteum-Zysten wird mit rötlich-orange für das Anbildungs- und z.T. für das Blütestadium angegeben. Über ein kräftiges Gelb soll sie schließlich in der Rückbildungsphase in ein Ocker übergehen. Abweichungen vom "normalen" Gelbkörper hinsichtlich der Farbe bestünden demnach nicht (CUBICK 1972).

Das Gewebe der Zystenwand stellt sich im Stadium der Anbildung und Blüte weich und durchsäftet dar. Der Hohlraum ist durch ein dünnes Häutchen ausgekleidet, während sich mit zunehmender Rückbildung das Gewebe verfestigt und die bindegewebige Auskleidung wesentlich dicker wird. In einem Drittel der Fälle ist der Hohlraum exzentrisch gelegen, die Wanddicke der Zyste daher sehr unterschiedlich (THEISSEN 1970, CUBICK 1972, BOROWSKI 1972). Mit wachsendem Hohlraum soll die Dicke der Zystenwand abnehmen (BOROWSKI 1972, FLOEHR 1974).

Die Form des Hohlraumes variiert sehr stark, zeigt aber keine Zyklusabhängigkeit. Sie ist z.T. kugelig oder birnenförmig, in manchen Fällen ist der Hohlraum mehrfach gekammert. Der Inhalt besteht aus trüber, bräunlich-gelber Flüssigkeit, die z.T. mit Fibrin und Blutgerinnseln durchsetzt ist. Manchmal füllen auch Blutkoagula den Hohlraum aus (DAWSON 1964, CUBICK 1972).

Adspektorisch ist äußerlich nur in wenigen Fällen zu entscheiden, ob es sich um eine Corpus luteum-Zyste handelt (GRUNERT 1969, THEISSEN 1970, FLOEHR 1974, OKUDA 1982). Selbst bei der Palpation exzentrierter Ovarien ist das "Erkennen" von Gelbkörperzysten von der Ausdehnung des Hohlraumes abhängig. Bei durchschnittlichen Maßen von 1,4 x 0,8 cm soll die Diagnose möglich sein, bei 1,24 x 0,5 cm dagegen nicht mehr (THEISSEN 1970).

Diese diagnostischen Probleme dürften wiederum erklären, warum Fragestellungen zur Corpus luteum-Zyste vorwiegend an Schlacht-

hofmaterial bearbeitet wurden. Ein entscheidender Nachteil dieser Untersuchungen ist, daß in den meisten Fällen das Zyklusgeschehen der Tiere nicht bekannt war. Da Corpus luteum-Zysten - vor allem in der Form - noch mehr als kompakte Gelbkörper variieren und die Hohlraumgröße vom Entwicklungsstadium unabhängig ist (FLOEHR 1974), kann die Zuordnung zu einem bestimmten Zyklusstadium anhand makroskopischer Befunde nur annähernd vorgenommen werden (MORROW et al. 1966, BOROWSKI 1972, FLOEHR 1974).

Anhand histologischer Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß Corpus luteum-Zysten in allen Zyklusphasen anzutreffen sind, ihr Vorkommen mit fortschreitendem Zyklus jedoch konstant abnimmt. Daraus schließt man, daß auch Corpus luteum-Zysten die einem kompakten Gelbkörper entsprechenden Stadien durchlaufen (HORSTMANN 1971). Die Involution des Hohlraumes endet mit der vollständigen Obliteration durch Schrumpfung der Zystenwand und Zellproliferation der bindegewebigen Auskleidung. Am 30. Tag liegt auch der zystöse Gelbkörper bereits unter der Ovaroberfläche (HORSTMANN und SCHWARZ 1973). Auch im histologischen Aufbau scheinen sich der kompakte und zystöse Gelbkörper nur wenig zu unterscheiden. Erwähnenswert ist unter anderem, daß im zystösen Gelbkörper die Septen und Gefäße, die das Gewebe der Corpus luteum-Zyste durchziehen, nicht so reichlich ausgebildet sind und die Luteinisierung der Zellen z.T. schwächer erscheint. Ferner ist für zystöse Gelbkörper typisch, daß - besonders in der späten Anbildungsphase - das Luteingewebe eine eher lockere Wachstums-

struktur und eine stärkere Ödematisierung zeigt. Auch in der Blüte- und beginnenden Rückbildungsphase liegen die Luteinzellen weniger dicht im Gewebeverband (HORSTMANN 1971). OKUDA (1982) führte an Gewebe von Corpora lutea mit und ohne Hohlraumbildung der Blütephase histometrische Untersuchungen durch. Dabei ergab sich, daß die Anteile der Zelltypen I-V, die in Anlehnung an FOLEY und GREENSTEIN (1958) bzw. THWAITES und EDEY (1970) klassifiziert wurden, zwischen Corpora lutea mit und ohne Hohlraumbildung keinen signifikanten Unterschied zeigen.

Demnach ist beim kompakten und zystösen Gelbkörper nicht nur die Morphologie der Luteinzellen, sondern auch ihr Verteilungsmuster im Gewebeverband ähnlich.

2.1.2.2. Progesterongehalt im Corpus luteum-Gewebe

Anhand histochemischer Untersuchungen des Luteingewebes konnten LOBEL und LEVY (1968) aufzeigen, daß Luteinzellen unterschiedlicher Morphologie z.T. dieselben enzymatischen Reaktionen aufweisen. Bestimmte morphologische Kriterien, die oft als Zeichen einer aktiven bzw. inaktiven Zelle gelten, sind ihrer Meinung nach zwar dazu geeignet, Gewebestrukturen vergleichend zu beschreiben, sollten aber nur mit Vorsicht zur Interpretation der endokrinen Aktivität herangezogen werden.

Fortschritte in der Hormonanalytik ermöglichten auch Progesteronbestimmungen im Corpus luteum-Gewebe (ERB und STORMSHAK 1961, HOFFMANN 1969, OKUDA 1982). Als Ergebnis wird einerseits die Progesteronkonzentration, d.h. die Progesteronmenge (μg) pro g Gewebe, andererseits der Gesamtprogesterongehalt (μg), d.h. das im gesamten Corpus luteum enthaltene Progesteron, angegeben.

Die bisher publizierten Ergebnisse über die Progesteronkonzentrationen zystöser Gelbkörper sind sehr widersprüchlich. HANSEL (1964) verglich die Progesteronwerte kompakter und zystöser Gelbkörper, die er anhand klinischer Daten dem 4., 7. und 11. Zyklustag zuordnete. Nicht nur die Progesteronkonzentration, sondern auch der Gesamtprogesterongehalt zystöser Gelbkörper waren dabei niedriger als in vergleichbaren kompakten Gelbkörpern. Nur am 4. Tag lag der Gesamtprogesterongehalt mit 49 μg geringfügig über dem kompakter Gelbkörper mit 35 μg .

Von HOFFMANN (1969) wurden bei 6 Corpus luteum-Zysten, deren Entwicklungsstadium jedoch nicht angegeben ist, Progesteronkonzentrationen von 15,1 - 34,4 $\mu\text{g/g}$ gemessen. GRUNERT (1969) verglich die Ergebnisse von HOFFMANN (1969) mit denen kompakter Gelbkörper des 15. Zyklustages, die mit durchschnittlich 50-70 $\mu\text{g/g}$ wesentlich über denen der Corpus luteum-Zysten lagen.

Zu völlig anderen Resultaten kam OKUDA (1982). Bezüglich der Progesteronkonzentration konnte er zwischen Corpora lutea mit und ohne Hohlraumbildung keinen statistisch nachweisbaren Unterschied feststellen. Hingegen lag der Gesamtprogesterongehalt von Corpora lutea mit Hohlraumbildung deutlich höher, was auf ihr höheres Gewicht zurückzuführen ist.

Die Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der einzelnen Autoren sind möglicherweise auf das unterschiedliche Ausgangsmaterial zurückzuführen. So verwendete OKUDA (1982) nur Gelbkörper der Blü-
tephase, während HANSEL (1964) nur solche der frühen und späten
Anbildungsphase untersuchte und bei GRUNERT (1969) die Ergebnisse
von HOFFMANN (1969) ohne Bezug zum Zyklusstadium in den Vergleich
eingingen.

2.1.2.3. Progesteronkonzentration im peripheren Blut

Als geeigneter Parameter zur Bewertung der Ovarfunktion wurde
vielfach die typische Progesteronverlaufskurve während des Re-
gelzyklus herangezogen (STABENFELDT et al. 1969, HENRICKS et al.
1970, KARG et al. 1969). Für Kühe mit zystösen Gelbkörpern wurden
derartige Hormonprofile bislang nicht erstellt. Das liegt vermut-
lich daran, daß, wie bereits erwähnt, Corpus luteum-Zysten kli-
nisch schwer erfaßbar sind.

Nur in wenigen Arbeiten wird auf die Progesteronsekretion von Corpus luteum-Zysten eingegangen. OKUDA (1982) fand bei geschlachteten Tieren, die entweder Blütegelbkörper mit oder ohne Hohlraumbildung aufwiesen, keinen Unterschied in der Blutprogesteronkonzentration. Andere Autoren erwähnen, allerdings nur am Rande und ohne Daten anzuführen, daß sie bei ihren Untersuchungen flüssigkeitsgefüllte Corpora lutea entdeckten, die Hormonwerte im Blut dieser Tiere jedoch keinen Unterschied zu den übrigen erkennen ließen (SPICER et al. 1981).

Eine verminderte Sekretion von Progesteron in die Peripherie, wie sie unter anderem für die Corpus luteum-Insuffizienz, einen bedeutenden Sterilitätsfaktor bei der Frau (BETTENDORF 1974, FRIEDRICH 1975, AKSEL 1980), typisch ist, scheint demnach bei Kühen mit Corpus luteum-Zysten nicht vorzuliegen. Es ist aber hervorzuheben, daß einmalige Blutentnahmen und -untersuchungen, wie sie z.B. von OKUDA (1982) durchgeführt wurden, nur beschränkte Aussagen über die Sekretion von Progesteron zulassen, da die pulsatile Freisetzung der Gonadotropine auch zu einer entsprechenden Variation der Blutprogesteronkonzentration führt (SCHÖNDORFER 1982).

2.2. Methoden zur Untersuchung von Luteingewebe in vitro

2.2.1. Inkubation von Gewebestücken

Die ersten In vitro-Untersuchungen bestanden darin, daß frisches Gewebe in kleine Stücke zerteilt und für einige Stunden in Pufferlösungen inkubiert wurde. SOTO und DEMARE (1960) konnten auf diese Weise an Rattenovargewebe die Synthese von Progesteron in vitro nachweisen.

Entsprechende Untersuchungen wurden auch am Luteingewebe des Rindes durchgeführt. Dem zerkleinerten Luteingewebe werden meistens Krebs-Ringer-Lösung oder andere geeignete Medien zugesetzt, und das Gemisch wird unter ständiger Bewegung und unter Zufuhr einer bestimmten Menge $\text{CO}_2\text{-O}_2$ inkubiert. Die Inkubationstemperatur liegt bei $+ 37^\circ\text{C}$, die Inkubationsdauer ist relativ kurz und beträgt meistens nicht mehr als 2-3 Stunden (ARMSTRONG und BLACK 1966, HANSEL 1966, HANSEL und SEIFART 1967, ARMSTRONG et al. 1970, CONDON 1975, CONDON und BLACK 1976, GODKIN et al. 1978).

Da man durch Zugabe von bovinem LH eine dosisabhängige Steigerung der Progesteronproduktion erreichen konnte, war die Inkubation von Gewebestücken zunächst auch als Bioassay für bovines LH interessant (HANSEL 1971).

Zusätzlich bot sich mit diesem Test die Möglichkeit, den Einfluß verschiedener anderer Hormone und Substanzen auf die Progesteron-

produktion in vitro zu prüfen. Hormone der Hypophyse wie FSH (MASON und SAVARD 1964, HANSEL 1966), Prolaktin (HANSEL 1966), TSH, ACTH und STH (HANSEL und SEIFART 1967) wurden ebenso mit Luteingewebe inkubiert wie Embryonenextrakte (GODKIN et al. 1978) oder Catecholamine (CONDON und BLACK 1976).

Andererseits war man auch bestrebt, die Methodik des Systems zu verbessern und zu standardisieren. Bereits ARMSTRONG und BLACK (1966) wiesen darauf hin, daß eine Vorinkubation von Luteingewebe bei + 37°C unter anaeroben Bedingungen die nachfolgende Progesteronproduktion stark beeinträchtigt, während eine Vorinkubation bei 0°C keinen Einfluß zeigt.

Aus demselben Grund wird davon abgeraten, für die Untersuchungen in vitro Schlachthofmaterial zu verwenden, da die Synthesekapazität des Gewebes stark reduziert ist, wenn es nach der Tötung des Tieres länger als 30 Minuten unter anaeroben Bedingungen im Schlachtkörper verbleibt. Die Zeitspanne zwischen Entnahme des Corpus luteum und der Inkubation in vitro sollte nicht mehr als 1 Stunde betragen (HANSEL 1971). Die meisten Autoren werden diesen Forderungen gerecht, indem sie nach Ovariectomie das Gewebe sofort weiterverarbeiten und bis zur Inkubation eisgekühlte Medien verwenden.

2.2.2. Inkubation von Zellsuspensionen

Zellsuspensionen, also isolierte, aber intakte Zellen des Gewebes, bieten gegenüber der vorher geschilderten Methode einige wichtige Vorteile. Erstens sind Diffusionsbarrieren, wie sie in Gewebestücken vorstellbar sind, eliminiert, zweitens kann mit homogenem Ausgangsmaterial gearbeitet werden, das auch quantitativ besser ausgenützt und somit für mehrere parallel laufende Experimente verwendet werden kann.

Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Isolierung boviner Luteinzellen sind sehr unterschiedlich. Folgende Schritte sind jedoch allen Arbeiten gemeinsam.

Das Gewebe wird in bestimmten Pufferlösungen oder synthetischen Nährmedien mit einem pH-Wert von 7,2 - 7,4 bearbeitet. Die zerkleinerten Gewebestücke werden enzymatisch aufgeschlossen. Hierbei dekantiert man nach bestimmten Zeitintervallen die überstehende Flüssigkeit mit den bereits isolierten Zellen und fügt frische Enzymlösung dazu. Die dekantierten Fraktionen werden gepoolt und gewaschen. Nach Bestimmung der Gesamtzahl vitaler Zellen, die durch verschiedene Färbemethoden bei der Zellzählung möglich ist, verteilt man eine bestimmte Menge intakter Zellen auf mehrere Inkubationsgefäße (GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ 1972a, SIMMONS et al. 1976).

Für die Zelldispergierung werden verschiedene Enzyme und Temperaturen empfohlen. Meistens arbeitet man bei einer Temperatur von + 37°C (SAYERS et al. 1971, GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ 1972a, 1972b, 1975, GREGORASZCZUK et al. 1980, GREGORASZCZUK 1983), zum Teil werden aber auch + 35°C (WILKINSON et al. 1976, PATE und CONDON 1982), + 33°C (HIXON und HANSEL 1979, WESTON und HIXON 1980) oder + 32°C (SIMMONS et al. 1976) angegeben.

Zur Brauchbarkeit verschiedener Enzyme gibt es widersprüchliche Meinungen. So soll Trypsin eher dazu geeignet sein, Luteingewebe aufzuschließen, als Collagenase. Es bietet zusätzlich den Vorteil, daß man der Zellsuspension nach der enzymatischen Inkubation Trypsininhibitoren zusetzen kann, die eine Adsorption des Enzyms an die Oberfläche und damit ein weiteres Angreifen der Einzelzelle verhindern (SAYERS et al. 1971, GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ 1972a). Bei GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ (1972a) wird das Gewebe vor dem endgültigen Aufschluß mit Trypsin und DNase einer 45-minütigen Vorverdauung mit einem Enzymgemisch aus Collagenase und Hyaluronidase unterzogen. Andere Enzyme, wie z.B. Pronase oder Elastase, sind ihren Experimenten zufolge nicht erfolgversprechend, zum Teil sollen sie sogar zelltoxisch wirken. Ein ähnliches Verfahren wird für das Luteingewebe der Ratte beschrieben, doch waren hier die Ergebnisse mit Pronase zufriedenstellend (WILKINSON et al. 1976). Eine sehr vereinfachte Technik stellen SIMMONS et al. (1976) vor. Sie verwenden ausschließlich Collagenase und erhalten durch nur einmaliges Erneuern der Enzymlösung innerhalb von 2 Stunden eine befriedigende Zellausbeute.

Neben der einfachen Durchführung sehen sie einen weiteren Vorteil ihrer Methode darin, daß sie im Vergleich zu GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ (1972a) nicht nur große Luteinzellen, sondern Luteinzellen unterschiedlicher Größe erhalten. Solche heterogenen Zellsuspensionen entsprechen ihrer Meinung nach den Verhältnissen wie sie in einem Corpus luteum in vivo vorliegen. Ihre Technik wird in zahlreichen Arbeiten übernommen (WILLIAMS und MARSH 1978a, 1978b, HIXON und HANSEL 1979, WESTON und HIXON 1980, DAVIS et al. 1981, KOOS und HANSEL 1981).

Diese relativ einfache Methode soll aber den Nachteil haben, daß nach der Collagenasebehandlung nicht nur Einzelzellen sondern auch sehr viele Zellklumpen vorliegen (KOOS und HANSEL 1981, RODGERS und O'SHEA 1982), was eine weitere enzymatische Behandlung mit Pronase (KOOS 1978, KOOS und HANSEL 1981) bzw. Trypsin (RODGERS und O'SHEA 1982) erfordert.

In den letzten Jahren ist man dazu übergegangen, nicht nur mit heterogenen Zellsuspensionen, d.h. mit allen Zellen, die man nach dem Gewebeaufschluß erhält, zu arbeiten, sondern die Zellen nach ihrer Größe in bestimmte Fraktionen aufzutrennen. KOOS (1978) konnte auf diese Weise 3 Zellfraktionen aus bovinen Luteinzellsuspensionen isolieren, für die er folgende Größen angibt: sehr kleine Zellen mit 8-11 μ , kleine Zellen mit 12-21 μ und große Zellen mit durchschnittlich 32 μ .

Diese Methode erlaubt Aussagen darüber, inwieweit die Anteile der einzelnen Zellfraktionen, wie sie in der Suspension vorliegen, denen im originären Gewebeverband entsprechen. Darüberhinaus kann der Beitrag einzelner Zellfraktionen zur Progesteronproduktion in vitro ermittelt werden (KOOS 1978, KOOS und HANSEL 1981, RODGERS und O'SHEA 1982).

2.2.3. Zellkultur

Eine weitere Möglichkeit, Einzelzellen nach dem Tod des Organismus "am Leben zu erhalten", stellt die Einschicht- oder Monolayerkultur dar. Zellen, die in Inkubationsgefäße ausgesät werden, wachsen unter bestimmten Bedingungen auf dem Gefäßboden zu einem Zellrasen aus. Im Unterschied zu den bereits angeführten Methoden können die Zellen nicht nur für Kurzzeitinkubationen von wenigen Stunden, sondern auch für Langzeitinkubationen von einigen Tagen bis zu mehreren Wochen herangezogen werden. Das wiederum setzt grundsätzlich voraus, daß unter sterilen Bedingungen gearbeitet wird und die Medien stets Antibiotika enthalten. Üblicherweise wird den Medien für die Zellkultur zusätzlich Serum beigemischt, da bestimmte Serumproteine das Anhaften am Gefäßboden und die Ausbreitung der Zellen fördern (SHODELL und RUBIN 1970, MAYR et al. 1974).

Besondere Bedeutung haben Monolayer-Zellkulturen in der Virusforschung, jedoch wurde mit dieser Technik auch die Gelbkörperfunktion in vitro bei verschiedenen Spezies untersucht (GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ 1972a, 1972b, 1975, WILKINSON et al. 1976, GREGORASZCZUK et al. 1980, GULYAS und HODGEN 1981, SAVION et al. 1981, PATE und CONDON 1982, GREGORASZCZUK 1983).

Mit Luteinzellkulturen des Rindes beschäftigten sich allerdings nur wenige Autoren (GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ 1972a, 1972b, 1975, PATE und CONDON 1982). Meistens wurden erheblich einfachere In vitro-Methoden, wie die Inkubation von Gewebestücken oder Zellsuspensionen, gewählt, was die vielen Arbeiten mit diesem System (siehe Kapitel 2.2.1. und 2.2.2.) bestätigen. Sollen jedoch besondere Aspekte zur endokrinen Leistung des Gelbkörpers berücksichtigt werden, so kann das eigentlich nur anhand der Zellkultur erfolgen. Zum einen kann man durch die Langzeitkultivierung der Zelle auch sogenannte Langzeiteffekte bestimmter Substanzen auf die Hormonproduktion beurteilen (GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ 1972b, 1975, PATE und CONDON 1982), zum anderen ist es möglich, den extrazellulären Progesterongehalt durch einfaches Absaugen des Mediums getrennt zu bestimmen. Dies erlaubt nicht nur Aussagen zur Progesteronproduktion insgesamt, wie es anhand der übrigen In vitro-Systeme üblich ist, sondern auch insbesondere zur Progesteronsekretion in vitro.

Bei Erstellung von Luteinzellkulturen des Rindes wurde zunächst geprüft, ob die Luteinzellen mit zunehmender Kultivierungsdauer

intakt und in ihrer Funktion differenziert bleiben (GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ 1972b, 1975). Durch verschiedene histochemische Färbemethoden war an 7 Tage alten Kulturen nachzuweisen, daß die Zellen Lipide, Glykogen und Dehydrogenasen, die für steroidproduzierende Zellen spezifisch sind, enthalten. Weitere Beweise für die Funktionstüchtigkeit der Zellen lieferten die Beobachtungen, daß radioaktiv markierte Aminosäuren und Progesteronvorläufer verarbeitet wurden, und die Progesteronsekretion durch LH dosisabhängig stimuliert werden konnte (GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ 1972b). Die Luteinzellkultur scheint also ein brauchbares In vitro-Modell zur Untersuchung der Gelbkörperfunktion zu sein.

Auffällig ist jedoch, daß auch unter ständiger LH-Zufuhr die Progesteronsekretion boviner Luteinzellen während der Kultivierung allmählich abnimmt. GULYAS und HODGEN (1981), die bei der Langzeitkultivierung von Luteinzellen des Rhesusaffen zum gleichen Ergebnis kamen, machen dafür die bereits nach 1-2 Tagen zu beobachtenden ultrastrukturellen Veränderungen der Zellen verantwortlich, wodurch ihrer Meinung nach für die Steroidproduktion essentielle Zellbestandteile verloren gehen. Auch PATE und CONDON (1982) verzeichneten, trotz Zugabe von LH, während der ersten 7 Kultivierungstage einen deutlichen Abfall der Progesteronsekretion boviner Luteinzellkulturen, jedoch stieg diese erneut am 9. und 11. Kulturtag an. Dieses Phänomen führen die Autoren darauf zurück, daß bei einer heterogenen Zellsuspension, wie sie bei ihnen im Gegensatz zu GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ (1972a, 1972b, 1975) vorlag, bestimmte Zellfraktionen erst im Laufe der

Kultivierung die Fähigkeit erhalten, auf gonadotrope Hormone anzusprechen.

Von Bedeutung für die endokrine Funktionsfähigkeit von Zellkulturen scheint auch zu sein, daß die verwendeten Medien kein Serum enthalten. PATE und CONDON (1982) konnten eine dosisabhängige Stimulierung der Progesteronsekretion durch LH nur in serumfreiem Medium erzielen. Sie schließen sich damit dem Hinweis anderer Autoren an, daß Serum bestimmte endokrine Interaktionen an der hormonproduzierenden Zelle hemmt (ERICKSON 1983, ORLY et al. 1980, SAVION et al. 1981).

Abschließend sollte ein Punkt nicht unbeachtet bleiben, der die angeführten In vitro-Systeme gemeinsam betrifft. In allen drei Fällen handelt es sich um sogenannte geschlossene Systeme, d.h., das entstehende Produkt, also Progesteron, wird während der Inkubation nicht abgeführt. Das könnte zu einem Produktstau führen, der die weitere Herstellung bzw. Sekretion von Progesteron verlangsamt oder blockiert. Ein Hinweis auf diese Problematik findet sich bei HANSEL (1971). Ein Superfusionssystem, bei welchem laufend Krebs-Ringer-Lösung durch eine das Gewebe enthaltende Zylinderkammer gepumpt wurde, erbrachte jedoch im Vergleich zur Inkubation von Gewebestücken im geschlossenen System keinen wesentlichen Unterschied.

2.3. Progesteronsynthese bzw. -sekretion von Luteingewebe in vitro

Sehr lange hat man angenommen, daß das produzierte Progesteron durch passive Diffusion, die durch einen Konzentrationsgradienten des diffundierenden Hormones kontrolliert wird, die Zelle verläßt. Neuere, vor allem elektronenmikroskopische Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, daß elektronendichte Granula der Zelle das synthetisierte Progesteron durch ein bestimmtes carrier protein (PBP = progesterone binding protein) akkumulieren und an der Zellmembran durch Exozytose abstoßen können (QUIRK et al. 1979, SAWYER et al. 1979, KALTENBACH und DUNN 1980, WILLCOX und THORBURN 1981, WILLCOX und ALISON 1982).

Synthese und Sekretion von Progesteron sind in vitro wie auch in vivo von bestimmten Faktoren abhängig. So scheinen für die Synthesekapazität des Gewebes die Proportion bestimmter Zelltypen, die Konzentration an Vorläufern und Cofaktoren und verschiedene Hormone eine Rolle zu spielen (KALTENBACH und DUNN 1980). Gonadotrope Hormone oder Substanzen können die Synthese wie auch die Sekretion von Progesteron induzieren, während andere Stoffe wiederum die Interaktion zwischen Gonadotropinen und deren Rezeptoren an der Luteinzelle stören.

Die Sekretion von Progesteron scheint unabhängig von der Synthese beeinflusbar zu sein. Dafür sprechen die Beobachtungen, daß nach LH-Zugabe in vitro zunehmend progesteronenthaltende Granula im

extrazellulären Raum festgestellt wurden (SAWYER et al. 1979, WILLCOX und ALISON 1982). Das kann unter anderem so interpretiert werden, daß Gonadotropine in der Lage sind, einen bestimmten extrazellulären Level an Progesteron aufrechtzuerhalten, indem sie auch nach beendeter Synthese noch für das Ausschleusen des vorhandenen Progesterons sorgen. Neben Gonadotropinen sollen auch progesteronbindende Proteine, wie z.B. Albumin und CBG (corticosteroid binding protein), zu einer syntheseunabhängigen Sekretion führen. Diese Proteine entfernen die Steroide von der Zelloberfläche und verhindern so einen intrazellulären Progesteronstau, der bei einer ständig aktiven Zelle vorstellbar ist (CONDON und PATE 1981).

Eine Differenzierung zwischen Progesteronsynthese und -sekretion kann nach der Inkubation von Luteingewebe in vitro nicht immer erfolgen. Das liegt daran, daß bestimmte Techniken, wie z.B. die Inkubation von Gewebestücken oder Zellsuspensionen, eine gesonderte Progesteronbestimmung im intra- und extrazellulären Bereich nur schwer ermöglichen. In solchen Fällen geben demnach die Werte das nach der Inkubation insgesamt vorliegende Progesteron wieder. In der Literatur tauchen dafür verschiedene Begriffe, wie z.B. Progesteronsynthese (ARMSTRONG und BLACK 1966, WILLIAMS und MARSH 1978a, 1978b, DAVIS et al. 1981), Progesteronproduktion (WESTON und HIXON 1980) oder Progesteronakkumulation (HIXON und HANSEL 1979), auf. Ist dagegen die Progesteronbestimmung auch im extrazellulären Bereich, also ausschließlich im Inkubationsmedium möglich, wie es z.B. bei der Zellkultur der Fall ist, so werden die

Ergebnisse in der Literatur als Progesteronsekretion (GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ 1972a) oder Progesteronfreisetzung (RHODES et al. 1982) wiedergegeben.

Die Vergleichbarkeit publizierter Ergebnisse aus diesem Arbeitsbereich wird zusätzlich dadurch erschwert, daß die untersuchten Gewebe- bzw. Zellmengen wie auch die Inkubationsdauer sehr stark variieren.

2.3.1. Einfluß des Entwicklungsstadiums der Corpora lutea

Die endokrine Leistung von Gewebe in vitro ist zunächst vom Ausgangsmaterial selbst abhängig. Das ist vor allem bei Gelbkörpergewebe zu berücksichtigen, da es verschiedene Entwicklungsstadien und damit auch Funktionsstadien durchläuft. Sehr viele Autoren haben zur Untersuchung des Gelbkörpers in vitro Gewebe trächtiger Tiere herangezogen (HANSEL 1971, GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ 1972a, 1972b, 1975, WILLIAMS und MARSH 1978a, 1978b, DAVIS et al. 1981), da sie sicher sein wollten, intaktes, funktionstüchtiges Gewebe zu bearbeiten. Wurde Luteingewebe periodischer Gelbkörper verwendet, so beschränkten sich die Untersuchungen beim Rind im Gegensatz zu denen bei anderen Spezies (GREGORASZCZUK et al. 1980, HUNTER 1981, GREGORASZCZUK 1983) auf ein einzelnes Entwicklungsstadium, wie z.B. die Anbildungsphase (KESLER et al. 1981) oder, was häufiger zu finden ist, auf die beginnende bis fortgeschrittene Blütephase (HIXON und HANSEL 1979, KOOS und HANSEL

1981, RHODES et al. 1982, PATE und CONDON 1982). Nur selten wurden vergleichende Untersuchungen von Gelbkörpern verschiedener Zyklusstadien durchgeführt (ARMSTRONG et al. 1964, ARMSTRONG und BLACK 1966). Es zeigte sich, daß sich die basale Progesteronproduktion boviner Gelbkörper des 3.-8. bzw. des 9.-13. Zyklustages kaum unterscheidet, während sie bei 14-18 Tage alten Gelbkörpern allmählich abnimmt und bei solchen des 19.-24. Zyklustages fast nicht mehr meßbar ist (ARMSTRONG und BLACK 1966).

Wird dem Luteingewebe LH zugeführt, so ist der prozentuale Anstieg der Progesteronproduktion bei Gewebe des 9.-13. und 14.-18. Zyklustages wesentlich stärker als bei solchen des 3.-8. Zyklustages. Luteingewebe des 19.-24. Zyklustages spricht auf LH hingegen nicht mehr an (ARMSTRONG und BLACK 1966). Auch Zellsuspensionen aus Gelbkörpern des 5. und 7. Zyklustages zeigen keine unterschiedliche basale Progesteronproduktion, jedoch sollen bereits Zellsuspensionen 7 Tage alter Corpora lutea wesentlich stärker auf LH reagieren als solche 5 Tage alter Gelbkörper (KESLER et al. 1981). Die geringen Unterschiede der basalen Progesteronproduktion bis zum 14. Zyklustag weisen nach ARMSTRONG und BLACK (1966) darauf hin, daß die endokrine Leistung des Organes letztendlich von seiner Gesamtgröße abhängen muß. Die unterschiedliche Empfindlichkeit für LH erklären sie damit, daß junges Luteingewebe in vivo eher einem hohen, älteres dagegen eher einem niedrigen LH-Spiegel ausgesetzt ist. Infolgedessen sollen junge Corpora lutea in vitro weniger durch LH stimulierbar sein als ältere.

2.3.2. Einfluß zugefügter Hormone

Die Untersuchungen an einem Organ bzw. an einer Zellkultur in vitro bieten den Vorteil, daß organspezifische Wirkungen verschiedener Substanzen leichter erkennbar sind als in vivo, wo sie durch die zusätzliche Reaktion anderer Organe unter Umständen kaschiert werden.

Die Überprüfung der Wirkung bestimmter Stoffe auf die Progesteronproduktion oder -sekretion von Luteingewebe in vitro erfolgt im wesentlichen aus zwei Gründen. Einerseits können Substanzen hinzugefügt werden, die auch unter physiologischen Bedingungen einwirken. In diesem Fall erlaubt das Ergebnis Rückschlüsse auf die Funktionstüchtigkeit des vorliegenden Gewebes. Andererseits besteht die Möglichkeit, den Einfluß von Stoffen mit bisher nicht geklärter Wirkung auf die endokrine Leistung des Corpus luteum zu überprüfen. Zur Beurteilung der Gelbkörperfunktion sind für die genannten Fragestellungen vor allem Hormone der Hypophyse, Steroidhormone des Ovars sowie Prostaglandine interessant.

2.3.2.1. Hormone der Hypophyse

Die Gonadotropine des Hypophysenvorderlappens, dazu gehören LH, FSH und Prolaktin, sind mit die wichtigsten Hormone zur Regulation der Ovaritätigkeit. Beim Rind soll LH (luteinizing hormone) allein den luteotropen Faktor darstellen (HANSEL 1971, HANSEL et

al. 1973). Das wurde vor allem offensichtlich, als man Luteingewebe in vitro mit verschiedenen Hormonen der Hypophyse inkubierte. Es zeigte sich, daß durch Zugabe von Hypophysenextrakten oder LH allein eine Steigerung der Progesteronproduktion in vitro möglich war, wohingegen andere Hormone wie FSH, STH, ACTH, TSH und LTH keine Wirkung erkennen ließen. Aus diesem Grund machte man für die luteotrope Wirkung der Hypophysenextrakte nur das darin enthaltene LH verantwortlich (HANSEL und SEIFART 1967, HANSEL 1971). Die luteotrope Wirkung von LH wird in allen Arbeiten, die sich mit bovinem Luteingewebe in vitro beschäftigen, bestätigt. Die Steigerung der Progesteronproduktion durch LH war sowohl bei der Inkubation von Gewebestücken (ARMSTRONG et al. 1964, 1970, MASON und SAVARD 1964, ARMSTRONG und BLACK 1966, HANSEL und SEIFART 1967, HANSEL et al. 1973, CONDON und PATE 1981) als auch von Zellsuspensionen (SIMMONS et al. 1976, HIXON und HANSEL 1979, DAVIS et al. 1981, RHODES et al. 1982) darstellbar. Ebenso war die Sekretion von Progesteron durch LH stimulierbar (GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ 1972a, 1972b, 1975, PATE und CONDON 1982).

Wie stark das Luteingewebe in vitro auf LH anspricht, scheint jedoch von bestimmten Faktoren abzuhängen. Unter anderem sind das Entwicklungsstadium des Gelbkörpers, das vorhandene Zellmaterial, die LH-Dosis sowie die Inkubationsdauer mit LH entscheidend. Es wurde bereits erwähnt (siehe Kapitel 2.3.1.), daß Corpora lutea der Rückbildungsphase, d.h. nach dem 18./19. Zyklustag, in vitro nicht mehr durch LH stimulierbar sind, während Gelbkörper der Blütephase stärker auf LH reagieren als solche der frühen Anbildungsphase (ARMSTRONG und BLACK 1966).

Ähnliche Unterschiede scheint es auch bei Corpora lutea verschiedener Trächtigkeitsstadien zu geben. Luteinzellkulturen von Gelbkörpern jüngerer Trächtigkeitsstadien zeigen eine erheblich höhere Basalsekretion als solche älterer Stadien. Anders verhält es sich mit dem Einfluß der Trächtigkeitsdauer auf die Stimulierbarkeit der Progesteronsekretion. Während nach Zusatz von LH die Progesteronsekretion von Luteinzellkulturen älterer Trächtigkeitsstadien auf den 5-fachen Wert ansteigt, erreicht sie in Material aus früheren Trächtigkeitsstadien nur das Zweifache des Basalwertes (GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ 1972a).

LH-empfindliches Luteingewebe, also solches der Regressionsphase ausgenommen, weist mit zunehmender LH-Menge auch eine steigende Progesteronproduktion bzw. -sekretion auf. Die in der Literatur genannten LH-Dosen schwanken sehr stark. Es werden Mengen von 100 pg bis 5 µg angegeben. Von einigen Autoren wurden Dosiswirkungskurven erstellt (GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ 1972a, HIXON und HANSEL 1979), die mit zunehmenden LH-Mengen einen kontinuierlichen Anstieg der Progesteronwerte erkennen lassen. Obwohl System und verwendetes Material unterschiedlich sind, geben die beiden oben aufgeführten Autorentams die minimal bzw. maximal effektive Dosis mit 100 pg bzw. 100 ng an.

Deutlich voneinander abweichende Ergebnisse liegen darüber vor, bis zu welchem Zeitpunkt nach LH-Zufuhr ein kontinuierlicher Anstieg der Progesteronwerte zu verfolgen ist. So soll die Progesteronproduktion, unabhängig von der LH-Dosis, bereits zwischen

2 und 4 Stunden ihren Maximalwert erreichen (HIXON und HANSEL 1979), während die Sekretion von Progesteron noch nach 10 Stunden kontinuierlich ansteigt (GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ 1972a). Auch innerhalb derselben Testreihen soll die Reaktion auf LH nicht einheitlich sein (SAYERS et al. 1971, SIMMONS et al. 1976), was möglicherweise auf die unterschiedliche Aktivität verschieden großer Luteinzellen in der Zellsuspension zurückzuführen ist. Große Luteinzellen (20 μm) zeigten nach Untersuchungen von KOOS und HANSEL (1981) eine 20 mal höhere Basalproduktion als kleine Luteinzellen (10-20 μm). Mit LH konnte jedoch die Produktion der kleinen Zellen um das 11-fache, die der großen nur um das doppelte erhöht werden. Ebenso sollen kleine Luteinzellen bereits auf geringe LH-Mengen ansprechen, die bei großen Luteinzellen noch keine Wirkung zeigen (KOOS und HANSEL 1981).

Beim Rind ist eine dem LH entsprechende luteotrope Wirkung auch für hCG (human chorionic gonadotropin) bekannt. Bereits 1961 konnten durch Injektion von hCG dieselben luteotropen Effekte am Gelbkörper des Rindes erzielt werden wie mit Hypophysenextrakten (SIMMONS und HANSEL 1961). Die exakte Charakterisierung des LH-hCG-Rezeptors im Corpus luteum des Rindes gelang erst vor kurzem (DATTATREYAMURTY et al. 1983), doch wurde schon früher darauf hingewiesen, daß hCG eine wesentlich höhere Rezeptoraffinität zeigt als LH. Man nimmt an, daß dies durch die unterschiedliche Stabilität der beiden Moleküle bedingt ist (PAPAIONANNOU und GOSPODAROWICZ 1975). Aus diesen Betrachtungen heraus erscheint es verwunderlich, daß bei In vitro-Untersuchungen des Gelbkörpers,

zumindest bei solchen des Rindes, die stimulierende Wirkung des hCG auf die Progesteronproduktion nur selten dargestellt wurde (KAWAKAMI und OCHI 1976, TAN et al. 1981).

Die Bedeutung von FSH (follicle stimulating hormone) für die Gelbkörperfunktion beim Rind wurde schon vor langem durch Inkubation mit Luteingewebe untersucht (HANSEL und SEIFART 1967, HANSEL et al. 1973). Dabei konnte keine luteotrope Wirkung aufgezeigt werden. Derzeit gibt es allerdings Hinweise dafür, daß auch im Gelbkörper des Rindes FSH-Rezeptoren existieren, vor allem sollen diese im Anbildungsstadium gehäuft zu finden sein (MANNS und NISWENDER 1983). Bei trächtigen sowie nichtträchtigen Tieren in der Lutealphase war eine pulsatile Freisetzung von Progesteron nach entsprechenden FSH-Impulsen feststellbar (SCHALLENBERGER et al. 1983). Demnach soll FSH eine Bedeutung für die Progesteronfreisetzung haben. Entsprechende Untersuchungen in vitro liegen darüber in der Literatur nicht vor.

Dem LTH (luteotropic hormone) wird beim Rind im Gegensatz zu anderen Spezies keine luteotrope Wirkung zugeschrieben. Dies konnte auch durch Inkubation mit Luteingewebe bestätigt werden (HANSEL 1966, HANSEL und SEIFART 1967, HANSEL et al. 1973). KAWAKAMI und OCHI (1976) allerdings betonen, daß LTH von einer bestimmten Dosis an auf bovine Luteinzellkulturen stark wachstumsfördernd wirkt. Untersuchungen über den Einfluß von LTH auf die Progesteronsekretion, wie sie z.B. von GREGORASZCZUK (1983) für Luteinzellkulturen des Schweines durchgeführt wurden, fehlen bislang beim Rind.

Neben den Gonadotropinen ist ein weiteres Hormon der Hypophyse, nämlich Oxytozin, für die Gelbkörperfunktion von Bedeutung. Nach seiner Verabreichung konnte die Bildung des Corpus luteum unterdrückt (HANSEL 1959) bzw. die Lutealphase verkürzt werden. Diesen "luteolytischen" Effekt des Oxytozins benutzte man häufig dazu, andere Substanzen zu testen. Es galten nur solche als luteotrop, die diese Oxytozinwirkung verhindern konnten (ARMSTRONG und HANSEL 1959, HANSEL und WAGNER 1960, DONALDSON und TAKKEN 1968). Schon damals wurde aber darauf hingewiesen, daß eine Verabreichung geringer Oxytozinmengen den Progesterongehalt im Corpus luteum-Gewebe erhöht (DONALDSON und TAKKEN 1968). Daß Oxytozin sowohl luteolytische als auch luteotrope Wirkung haben kann, geht auch aus Untersuchungen an Luteingewebe in vitro hervor. Bei Corpora lutea frühgravider Tiere konnten TAN et al. (1981) einen dosisabhängigen Einfluß des Oxytozins auf die Progesteronproduktion von Zellsuspensionen feststellen. Geringe Oxytozinmengen erhöhten die Progesteronproduktion der Zellen, die gleichzeitig stimulierende Wirkung von hCG wurde nicht beeinträchtigt. Höhere Oxytozindosen zeigten sich hingegen nicht luteotrop, hemmten jedoch die Stimulation der Progesteronproduktion durch hCG. Nach Meinung der Autoren könnte daher beim Rind eine unterdrückte Oxytozinfreisetzung Voraussetzung für ein funktionstüchtiges Corpus luteum in der Frühgravidität sein. Für den periodischen Gelbkörper des Rindes liegen In vitro-Untersuchungen von PEKALA et al. (1983) vor. Der luteotrope Effekt von LH ist ihren Betrachtungen zufolge durch gleichzeitige Inkubation mit Oxytozin nicht zu beeinflussen. Eine Vorinkubation mit Oxytozin verstärkte jedoch den

anschließenden LH-Effekt um ein Vielfaches. Im Gegensatz zum Corpus luteum graviditatis scheinen Oxytozin und Gonadotropine am periodischen Gelbkörper synergistisch auf die Progesteronproduktion zu wirken. Diese Betrachtungen sind vor allem deshalb von aktuellem Interesse, weil erst vor kurzem aufgezeigt werden konnte, daß das Corpus luteum des Rindes selbst beträchtliche Mengen an Oxytozin enthält (FIELDS et al. 1983, SCHAMS et al. 1983).

2.3.2.2. Steroidhormone des Ovars

Da in den Luteinzellen des Rindes ein "estrogen-binding-protein" nachgewiesen wurde (KIMBALL und HANSEL 1974), wird eine direkte Wirkung der Östrogene an der Luteinzelle nicht ausgeschlossen. In vitro-Untersuchungen liefern dazu jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Nach HIXON und HANSEL (1979) greift 17 β -Östradiol nicht an der Luteinzelle direkt an. Die Zugabe verschiedener Mengen von 17 β -Östradiol hatte keinen Einfluß auf die Progesteronproduktion, auch die Stimulation mit LH wurde nicht behindert. Dagegen konnte SAUER (1975) anhand boviner Luteinzellkulturen aus Gelbkörpern der Blütephase eine hemmende Wirkung von Östrogenen auf die Progesteronsekretion nachweisen. Sowohl Östradiol als auch Östron verhinderten eine Stimulation der Progesteronsekretion durch LH, während nach WILLIAMS und MARSH (1978a) die LH-induzierte Progesteronproduktion boviner Luteinzellsuspensionen nur durch 17 β -Östradiol hemmbar war, Östron und 17 α -Östradiol dagegen keine Wirkung erkennen ließen.

Die luteolytische Wirkung von Östradiol wird auch mit Androgenen in Verbindung gebracht. Nach Inkubation boviner Luteinzellsuspensionen mit Testosteron soll die Progesteronproduktion stark abfallen. Man schreibt diese Wirkung nicht dem Testosteron selbst zu, sondern vermutet, daß durch Aromatisierung des Testosterons Östradiol entsteht und dieses die luteolytische Wirkung hervorruft (WILLIAMS und MARSH 1978a). Daß die Luteinzellen Testosteron zu Östradiol umwandeln können, wird von anderen Autoren bestritten (SAVARD 1973, KOOS und HANSEL 1981, URSELY et al. 1981). Hinweise dafür, daß auch im Gelbkörper Androgene gebildet werden, finden sich bei SHEMESH et al. (1975). Sie konnten in Gelbkörpern der Blütephase beträchtliche Mengen an Testosteron nachweisen. Darüberhinaus beobachteten sie, daß Luteingewebe in vitro durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ zu einer erhöhten Testosteronsynthese angeregt wird. Da auch in vivo mit Ende der Blüte- und Beginn der Rückbildungsphase vermehrt Androgene, wie Testosteron, Dehydroandrostendion und vor allem Androstendion im peripheren Blutplasma zu finden sind, hält man es für möglich, daß $\text{PGF}_{2\alpha}$ gegen Zyklusende zu einer Änderung des Steroidmetabolismus im Gelbkörper führt und so die Bildung von Androgenen hervorruft (WISE et al. 1982). Die Autoren nehmen aber nicht dazu Stellung, ob diese Androgene direkt oder etwa über die Umwandlung zu Östradiol einen Einfluß auf die Gelbkörperfunktion haben.

2.3.2.3. Prostaglandine

Schon seit längerem weiß man, daß auch Prostaglandine eine Bedeutung für die Gelbkörperfunktion haben. Die luteolytische Wirkung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ wird bereits routinemäßig für therapeutische Zwecke herangezogen.

Neben den luteolytischen Effekten werden auch luteotrope Einflüsse des $\text{PGF}_{2\alpha}$ diskutiert. Wurden geringere Dosen direkt ins Ovar injiziert, so war anschließend der Progesterongehalt im Corpus luteum-Gewebe deutlich erhöht. Diese luteotrope Wirkung scheint eher den Ergebnissen, wie sie an Luteingewebe in vitro erzielt wurden, zu entsprechen. Sämtliche Prostaglandine, d.h. PGE_1 , PGE_2 , PGA_1 , PGA_2 , aber auch $\text{PGF}_{2\alpha}$ steigern die Progesteronproduktion während der Inkubation von Gewebestücken (HANSEL et al. 1973). Dieser Effekt konnte auch bei der Inkubation boviner Luteinzellsuspensionen mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ festgestellt werden (HIXON und HANSEL 1979). Nach KOOS und HANSEL (1981) ist jedoch weder die Progesteronproduktion der kleinen noch die der großen Luteinzellen mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ zu stimulieren.

Im Gegensatz zu den widersprüchlichen Ergebnissen, die mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ erzielt wurden, ist die Ansicht über die Wirkung von PGE_2 auf die Luteinzelle einheitlich. Es wird vermutet, daß PGE_2 mit seiner ausgesprochen luteotropen Wirkung eine Bedeutung für den Gelbkörper der Frühgravidität hat (NISWENDER 1981). So soll $\text{PGF}_{2\alpha}$ in vitro zwar die stimulierende Wirkung von LH auf die Progesteronsekretion hemmen können, nicht jedoch diejenige von PGE_2 (FLETCHER und NISWENDER 1980).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material

Zur Standardisierung des hier gewählten In vitro-Verfahrens wurden an ca. 70 Corpora lutea, die am Schlachthof München gesammelt wurden, methodische Voruntersuchungen durchgeführt. Für die eigentlichen Untersuchungen zur vergleichenden Überprüfung der Progesteronsekretion wurden 14 Corpora lutea periodica mit Hohlraumbildung und 22 Corpora lutea periodica ohne Hohlraumbildung, die in dem oben erwähnten Material nicht enthalten sind, herangezogen (Tab. 1). Diese wurden ebenfalls geschlachteten Tieren entnommen. Die Corpora lutea wurden anhand makroskopischer Kriterien den unterschiedlichen Stadien der Lutealphase zugeordnet.

Zusätzlich wurden 2 Corpora lutea graviditatis ohne Hohlraumbildung - ebenfalls Schlachthofmaterial - in die Untersuchungen einbezogen. Die Scheitelsteißlänge der Embryonen sprach für eine Trächtigkeitsdauer von 30 und 90 Tagen.

Die am Schlachthof gewonnenen Organe stammten ausschließlich von Kühen der Rasse Deutsches Fleckvieh, die keine makroskopisch erkennbaren Veränderungen am Genitale aufwiesen.

Tab. 1: Anzahl der untersuchten Corpora lutea verschiedener Entwicklungsstadien

Untersuchungs- material	Entwicklungsstadien				Total
	I	II	III	IV	
Corpora lutea mit Hohlraumbildung	-	5	6	3	14
Corpora lutea ohne Hohlraumbildung	4	6*	10*	2	22
Total					36

I = frühe Anbildungsphase

III = Blütephase

II = späte Anbildungsphase

IV = Rückbildungsphase

* = Corpora lutea der ovariektomierten Tiere nicht enthalten

Durch Herzpunktion des rechten Ventrikels wurde bei jedem Tier nach der Schlachtung eine Blutprobe zur Progesteronbestimmung entnommen (weitere Verarbeitung s. Kap. 3.2.9.).

Um den Einfluß eventueller postmortalen Veränderungen bei dem verwerteten Schlachthofmaterial beurteilen zu können, wurden zwei weitere Corpora lutea (ohne Hohlraumbildung), die am 7. bzw. 15. Tag des Zyklus per Ovariektomie von 2 Fleckviehkühen gewonnen wurden, untersucht.

3.2. Methoden

3.2.1. Gewinnung und Verarbeitung der Corpora lutea

Die Ovarien wurden, soweit möglich, unter sterilen Bedingungen dem frisch geschlachteten Tier entnommen und vorerst in einem eisgekühlten Thermosgefäß aufbewahrt. Noch auf dem Schlachthof wurden die Corpora lutea mit sterilen Instrumenten aus dem Ovar herauspräpariert, in 70 %igem Alkohol gewaschen, kurz abgeflammt und sofort in Gefäße mit eisgekühlter BSS-Lösung (s. Kapitel 3.2.3.) verbracht. Die Gefäße mit den Corpora lutea wie auch die Blutproben wurden in einer Kühlbox zum Labor transportiert.

In gleicher Weise wurden die Corpora lutea der ovariektomierten Tiere verarbeitet.

3.2.2. Beurteilung des Funktionsstadiums

3.2.2.1. Makroskopische Untersuchung

Zur morphologischen Charakterisierung wurden Farbe, Konsistenz, Volumen und Höhe des Gelbkörperpilzes beurteilt (Tab. 2). Die Pilzhöhe wurde mit einer Schublehre gemessen. Die Bestimmung des Volumens erfolgte durch Messung des Verdrängungsvolumens. Dazu wurde jedes Corpus luteum vor der Zerkleinerung in ein graduier-

Tab. 2: Bestimmung des Entwicklungsstadiums von Corpora lutea anhand makroskopischer Befunde

Kriterium	Entwicklungsstadien			
	I	II	III	IV
Farbe	braunrot	dunkelrot	rotgelb	gelb
Konsistenz (Grade)	1	2	3	4-5
Volumen (cm ³)	< 3	≥ 3	> 5	≤ 5
Pilzhöhe (cm)	< 1	≥ 1	> 1	≤ 1

I = frühe Anbildungsphase

III = Blütephase

II = späte Anbildungsphase

IV = Rückbildungsphase

tes Zentrifugenglas, das sterile physiologische NaCl-Lösung enthielt, gegeben und 1 ml der verdrängten Flüssigkeit einem cm³ Corpus luteum-Gewebe gleichgesetzt. Die Konsistenz des Gewebes wurde bei der Zerkleinerung bewertet und subjektiv in 5 Grade eingeteilt:

- 1 : sehr weich, Gewebe mit den Fingern zerdrückbar
- 2 : weich, Gewebe mit dem Skalpellerücken zerdrückbar
- 3 : fest-elastisch, Gewebe sehr leicht schneidbar
- 4 : fest, Gewebe leicht schneidbar
- 5 : derb, Gewebe weniger leicht schneidbar.

Auf Grund dieser morphologischen Kriterien wurden die von den Schlachttieren gewonnenen Corpora lutea 4 verschiedenen Funktionsstadien der Lutealphase zugeordnet, wobei frühe und späte Anbildungsphase, Blütephase sowie Rückbildungsphase unterschieden wurden (Tab. 1). Die entscheidenden Parameter für die Klassifizierung waren die Konsistenz und die Farbe der Corpora lutea.

3.2.2.2. Progesteronkonzentration im Blutserum

Die Progesteronbestimmung im Blutserum der geschlachteten Tiere diente zur Kontrolle der makroskopischen Zuordnung zu bestimmten Zyklusstadien. Progesteronwerte unter 1 ng/ml Blutserum wurden als Zeichen für noch nicht oder für nicht mehr endokrin aktive Corpora lutea gewertet.

3.2.3. Nährmedien

Für die Versuche wurden die beiden folgenden Lösungen als Nährmedien herangezogen:

1) BSS-Lösung (balanced salt solution)

1000 ml Aqua bidestillata enthielten:

8,0 g NaCl

0,2 g KCl

1,0 g NaHCO_3

2,0 Glucose

20 mMol Hepes-Puffersubstanz

10 ml einer 0,1 %igen Phenolrotlösung

2) Medium 199

(Flow Laboratories, Rockville, M.D. USA)

Die für 1000 ml abgepackte Trockensubstanz war bereits mit Earle Salzen, L-Glutamin, 20 mMol Hepes-Puffersubstanz und dem Indikator Phenolrot supplementiert.

Die Lösung der Trockensubstanz erfolgte in 1000 ml Aqua bidest., das zusätzlich 2,2 g NaHCO_3 enthielt.

BSS-Lösung sowie Medium 199 enthielten pro Liter folgende Antibiotika:

- 100 000 I.E. Penicillin (Penicillin-Na-Salz, Fa. Hoechst)
- 0,1 g Streptomycin (Dihydrostreptomycinsulfat, Serva Bioch.)
- 2 mg Amphotericin B-Trockensubstanz (Fa. Squibb)

Der BSS-Lösung wurden pro Liter außerdem 20 mg Polymyxin B (Fa. Pfizer) zugegeben.

Die für den Transport der Corpora lutea vom Schlachthof zum Labor verwendete BSS-Lösung war mit der 5-fachen Menge an Antibiotika angereichert.

Nach der Herstellung wurden alle Lösungen (s.a. 3.2.4.2.) mit 5 n NaOH auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt und durch ein Membranfilter (Porengröße 0,2 μm) eines Druckfiltrationsgerätes (Fa. Sartorius) steril filtriert.

3.2.4. Dispergierung des Luteingewebes

Die Weiterverarbeitung der Corpora lutea erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Flow Bank (Ceag Shirp Reinraumtechnik). Nach der Bestimmung des Volumens (s. Kap. 3.2.2.1.) wurde zunächst bei allen Corpora lutea versucht, mit einer Tuberkulinspritze aus dem Organinneren Flüssigkeit zu aspirieren. War flüssiger Inhalt vorhanden, so wurde seine Menge festgestellt.

Nach dem Waschen der Organe in eisgekühlter BSS-Lösung wurde eine äußere Schicht der Corpora lutea von ca. 2 mm mit einer kleinen Schere abgetragen und verworfen. Nach einer groben Zerkleinerung mit einem Skalpell wurde das Gewebe mit einer Rasierklinge auf einer kleinen Stahlplatte in eisgekühlter BSS-Lösung in ca. 1 mm große Würfel geschnitten. Die bindegewebige Auskleidung der Corpora lutea mit Hohlraumbildung wurde stets vorher abpräpariert und verworfen.

Vor der enzymatischen Inkubation wurden die Gewebestücke nochmals in BSS-Lösung gewaschen.

3.2.4.1 Voruntersuchungen

Die Überprüfung der von SIMMONS et al. (1976) und von GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ (1972a) beschriebenen Verfahren brachte keine befriedigenden Ergebnisse. Nach Anwendung von Collagenase (SIMMONS et al. 1976) zeigte die Zellsuspension eine starke Trübung, die auch durch mehrmaliges Waschen nicht beseitigt werden konnte. Eine ausreichende Zellmenge war nicht, wie von SIMMONS et al. (1976) angeführt, bei einer Inkubationstemperatur von + 32°C, sondern erst bei einer Temperatur von + 37°C zu erhalten. Die so gewonnenen Zellen hatten jedoch eine reduzierte Vitalitätsrate, die durchschnittlich unter 40 % lag. Zusätzlich waren in der Zellsuspension zahlreiche Bindegewebsfasern und Zellhaufen vorhanden, die auch nach Filtration durch ein Drahtsieb nicht völlig

beseitigt werden konnten. Eine homogene Verteilung der Zellen auf die Kulturgefäße war deshalb mit dieser Methode nicht möglich. Auch mit der von GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ (1972a) verwendeten Technik mit Trypsin war kein Gewebeaufschluß zu erzielen; auch die Anwendung verschiedener Enzympräparate (Trypsin Trockensubstanz 1:250, Fa. Seromed, Fa. Serva) und -konzentrationen (0,25 %; 0,2 %; 0,1 %) führte ebenfalls nicht zum Erfolg.

Aus diesem Grund wurde Pankreatin, ein Enzym, das erfolgreich bei Hypophysengewebe verwendet wird (BRAUN 1982), herangezogen. Während die enzymatische Vorverdauung noch in Anlehnung an GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ (1972a) vorgenommen wurde, kam für den endgültigen Gewebeaufschluß keine Trypsin-Lösung, sondern eine BSS-Lösung mit 0,25 % Pankreatin (Viokase, Gibco, Grand Island, USA) für eine 2 mal 20-minütige Inkubation zum Einsatz. Mit diesem Enzym war es zum ersten Mal möglich, eine klare Zellsuspension mit einer großen Ausbeute an Einzelzellen zu erhalten. Die Vitalitätsrate lag bei knapp 60 %; sie konnte auch durch Verwendung niedrigerer Enzymkonzentrationen (bis zu 0,1 % Pankreatin) nicht verbessert werden.

In weiteren Versuchen wurde die Inkubationsdauer von 20 auf 10 Minuten und die Inkubationstemperatur von + 37°C auf + 35°C herabgesetzt. Erst unter diesen Bedingungen war es möglich, mit Pankreatin eine befriedigende Zellausbeute mit einem hohen Anteil vitaler Zellen (> 75 %) zu erhalten.

Ferner wurde die enzymatische Vorverdauung, wie sie WILKINSON et al. (1976) für Rattenluteingewebe angeben, erprobt, d.h. es wurde eine Lösung mit 0,125 % Collagenase und 0,125 % Hyaluronidase, also erheblich geringere Konzentrationen als von GOSPODAROWICZ und GOSPADOROWICZ (1972a) beschrieben, verwendet. Mit diesem Verfahren war die enzymatische Vorverdauung auch bei Luteingewebe des Rindes noch ausreichend, ließ zugleich aber mehr Gewebe für den endgültigen Aufschluß mit Pankreatin zurück. Das war vor allem dann wichtig, wenn wenig Gewebe zur Verfügung stand, wie z.B. bei Corpora lutea der frühen Anbildungsphase oder bei bestimmten Corpora lutea mit Hohlraumbildung.

3.2.4.2. Standardisierung des Verfahrens

Verwendete Lösungen zur enzymatischen Dispergierung:

Enzymlösung I:

100 ml BSS-Lösung enthielten: 0,125 g Collagenase (CLS Typ I,
125 - 250 Einheiten/mg
Fa. Interchem)
0,125 g Hyaluronidase (Typ I-S,
from bovine testes, 300 Einheiten/mg, Sigma Chemicals, St.
Louis)
3,000 g Bovines Serum Albumin
(Fraction V, Sigma Chemicals, St.
Louis).

Enzymlösung II:

100 ml BSS-Lösung enthielten: 0,25 g Pankreatin (Viokase, Gibco, Grand Island, N.Y., USA).

Suspensionsmedium:

Medium 199, supplementiert mit 10 % Horse Serum (Gibco, Europe) und 3 % Bovinem Serum Albumin (Fraction V, Sigma Chemicals, St. Louis).

Serumhaltiges Medium:

Medium 199 mit 10 % Horse Serum (Gibco, Europe).

Die einzelnen Dispergierungsschritte erfolgten grundsätzlich bei einer Inkubationstemperatur von + 35°C (Wasserbad) und wurden durch das Rühren mit silikonisierten Stäben (Rührgeschwindigkeit 150 Umdrehungen pro Minute) mechanisch unterstützt.

Der Ablauf war wie folgt:

- Vorinkubation der Gewebestücke in enzymfreier BSS-Lösung: 15 Minuten.
 - Zweimaliges Waschen der Gewebestücke in BSS-Lösung.
 - Vorverdauung mit 20 ml Enzymlösung I: 30 Minuten, bei festerem Luteingewebe 45 Minuten.
 - Dekantieren und Verwerfen des Überstandes.
 - Inkubation mit 10 ml Enzymlösung II: 60 Minuten insgesamt.
- Durch Abgießen des Überstandes nach jeweils 10 Minuten ergaben

sich 6 Fraktionen, die in in einem Zentrifugenglas mit 5 ml Suspensionsmedium gepoolt und bis zum Zentrifugieren bei + 4°C aufbewahrt wurden. Nach dem Abgießen des Überstandes erhielten die verbliebenen Gewebestücke jeweils 10 ml frische Enzymlösung II.

- Die gepoolten Fraktionen mit den isolierten Zellen wurden in einer Kühlzentrifuge (+ 4°C, 100 g) 7 Minuten lang zentrifugiert; der Überstand wurde abgehebert und verworfen.
- Das Zellsediment wurde anschließend in 5 ml serumhaltigem Medium resuspendiert und die Zellsuspension durch wiederholtes Aufsaugen in einer 10 ml-Glaspipette gut durchmischt.
- Das Zentrifugieren und Resuspendieren der Zellen wurde noch 2 mal wiederholt.
- Abschließend wurde die Zellsuspension durch ein Drahtsieb (Maschengröße: 1 mm²) filtriert.

3.2.5. Zählung und Vitalitätsbestimmung der Luteinzellen

Die Konzentration und Vitalitätsrate der Zellsuspension wurden in der Zählkammer nach Türk bestimmt, wozu 200 µl der Zellsuspension mit 100 µl einer 1 %igen Trypanblaulösung (MAYR et al. 1974) vermischt und anschließend sofort gezählt wurden. Tote Zellen färben sich mit dieser Farblösung blau an. Durch Subtraktion der gefärbten von den insgesamt erfaßten Zellen ergab sich die Anzahl intakter Zellen. Der prozentuale Anteil der intakten Zellen an der Gesamtzahl stellt die Vitalitätsrate (%) dar.

Von jeder Zellsuspension wurden zwei getrennte Zählungen durchgeführt, wobei der Mittelwert für die nachfolgenden Berechnungen zur Verdünnung der Zellsuspension verwendet wurde. Pro Zählung wurden 4 x 16 große Felder ausgewertet. Bei einer Kammerhöhe von $0,1 \text{ mm}^3$, einer Feldfläche von $1/25 \text{ mm}^2$ und einem Verdünnungsfaktor von 1,5 konnte die Zelldichte (D) intakter Zellen pro mm^3 folgendermaßen berechnet werden:

$$D = Z/64 \times 25 \times 10 \times 1,5$$

Da von jeder Zellsuspension zunächst 5 ml vorlagen und jeweils 200 μl für die Zellzählung verwendet wurden, ergab sich die Gesamtzahl (G) intakter Zellen in den restlichen 4,8 ml durch:

$$G = D \times 1000 \times 4,8$$

3.2.6. Hormonelle Beeinflussung der Progesteronsekretion

3.2.6.1 Voruntersuchungen mit LH bzw. hCG

Da der Literatur nicht zu entnehmen ist, welcher Zeitraum für die hormonelle Inkubation von Zellkulturen günstig ist, wurde vorerst die Progesteronsekretion nach Zugabe von LH bzw. hCG in Abhängigkeit vom Intervall Zellaussaat bis Hormonzugabe (Vorinkubation) und der Einwirkungsdauer (Inkubation) untersucht. Darüberhinaus wurde geprüft, ob sich Unterschiede zwischen einer Inkubation in serumhaltigem und serumfreiem Medium ergeben.

Die Zellsuspensionen wurden zunächst mit serumhaltigem Medium so verdünnt, daß eine Konzentration von 4×10^5 intakten Zellen/ml vorlag. Pro Kultur wurden 750 μ l serumhaltiges Medium und 250 μ l der Zellsuspension in Gewebekulturschalen (Costar, Cluster²⁴; 2 cm²/Kultur, Nr. 3524, Cambridge Mass., USA) ausgesät. Somit lagen in jeder Kultur 100 000 Zellen in 1 ml Medium vor. Nach der Aussaat wurden die Kulturen bei + 37°C und einem Luft-CO₂-Gemisch von 95 : 5 bebrütet.

3.2.6.1.1. Vorinkubations- und Inkubationsdauer

Für die Stimulierung mit LH bzw. hCG wurden zunächst verschiedene Zeiträume für Vorinkubation und anschließender Inkubation kombiniert (Abb. 1).

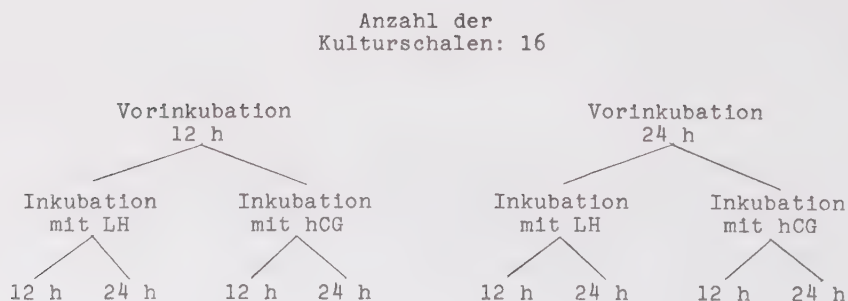


Abb. 1: Stimulation der Progesteronsekretion durch LH und hCG mit unterschiedlicher Vorinkubations- und Inkubationsdauer der Zellkulturen

Nach der Vorinkubation wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen zweimal gewaschen und LH bzw. hCG in logarithmischer Verdünnungsreihe mit 7 Verdünnungsstufen (Tab. 3a, 3b) zugesetzt. Dabei wurden jeder Kultur entweder 900 µl Medium und 100 µl der jeweiligen Hormonlösung (Versuchsgruppe) oder 1000 µl Medium (Kontrollgruppe) zugegeben. Pro Versuchsansatz wurden 6 Kulturen verwendet. Für eine Versuchsgruppe waren zwei Gewebekulturschalen à 24 Kulturen erforderlich (Abb. 2), d.h., daß für einen Versuch, wie er in Abb. 1 dargestellt ist, insgesamt 16 Gewebekulturschalen mit je 24 Einzelkulturen angelegt werden mußten. In die Auswertung gingen die Mittelwerte der 6 Einzelkulturen pro Versuchsansatz (Abb. 2) ein.

Kulturschale 1							Kulturschale 2						
	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
A							A						
B							B						
C							C						
D							D						

A1 - A6: Kontrolle	A1 - A6: Hormonkonzentration 4
B1 - B6: Hormonkonzentration 1	B1 - B6: Hormonkonzentration 5
C1 - C6: Hormonkonzentration 2	C1 - C6: Hormonkonzentration 6
D1 - D6: Hormonkonzentration 3	D1 - D6: Hormonkonzentration 7

Abb. 2: Beschickung der Kulturschalen (Costar Cluster²⁴) mit verschiedenen LH- bzw. hCG-Konzentrationen (Tab. 3a, 3b) - schematisch
Hormonkonzentration 1: niedrigste Konzentration
Hormonkonzentration 7: höchste Konzentration

Tab. 3a: Übersicht der in der Zellkultur verwendeten Hormone

Hormon	Präparat	Hersteller	Konzentration der Stammlösung	höchster Hormongehalt (Hormonkonzentration 7) pro ml	niedrigster Hormongehalt (Hormonkonzentration 1) pro ml
LH-bovin (Luteinizing Hormone)	NIAMDD -bLH-4 2,4 Units/mg	NIAMDD, Harbor-Ucla Medical Center, Torr. Calif., USA	100 µg/ml phys. NaCl	10000 ng	0,01 ng
hCG (human chorionic gonadotropin)	Exluton ^R	Venle Veterinär Chemie GmbH	1000 I.E./ ml Medium	1000 I.E.	0,001 I.E.
Prolaktin-bovin	NIAMDD -b-PRL-6 30 I.U./mg	NIAMDD, Harbor-Ucla Medical Center, Torr. Calif., USA	0,5 mg/ml NaHCO ₃ - Lösung	100000 ng	0,1 ng
PGE ₂ (Prostaglandin E ₂)	PGE ₂ synthetisch No. P 5640	Sigma Chemicals St. Louis USA	1 mg/ml 70 %iges Äthanol	10000 ng	0,01 ng
PGF _{2α} (Prostaglandin F _{2α})	Estrumate ^R 250 µg Cloprostenol/ml	ICI (Imp.Chem. Industr.Lim.Pharm.Dir. Cheshire/England	0,04 ml Injek- tionslösung/ ml Medium	10000 ng	0,01 ng
PGF _{2α} (Prostaglandin F _{2α})	PGF _{2α} synthetisch No. P 3023	Sigma Chemicals St. Louis USA	1 mg/ml 70 %iges Äthanol	10000 ng	0,01 ng

Tab. 3b: Übersicht der in der Zellkultur verwendeten Hormone

Hormon	Präparat	Hersteller	Konzentration der Stammlösung	höchster Hormongehalt (Hormonkonzentration 7) pro ml	niedrigster Hormongehalt (Hormonkonzentration 1) pro ml
17- β -Östradiol	β -Estradiol-3 Methylether crystallin	Sigma Chemicals St. Louis USA	1 mg/ml 70 %iges Äthanol	100 ng	0,01 pg
Androstendion	4 -Androstene 3,17 diene crystallin	Sigma Chemicals St. Louis USA	1 mg/ml 70 %iges Äthanol	100 ng	0,01 pg
Oxytozin	Orasthin ^R 5 mg Chloro- butanol = 101.E. synthetisches Oxytozin	Hoechst AG	0,1 ml Injek- tionslösung/ ml Medium	1 I.E.	10^{-6} I.E.
Oxytozin	Oxytozin Grade X, synthe- tic white lyoph. powder 100 I.E./mg	Sigma Chemicals St. Louis USA	1 mg/ml Medium	1 I.E.	10^{-6} I.E.

3.2.6.1.2. Serumhaltiges und serumfreies Medium

Für die Vorinkubation im Brutschrank (Intervall Zellaussaat bis Hormonzugabe) wurde stets serumhaltiges Medium verwendet, um das Anhaften und Ausbreiten der Zellen nach der Aussaat zu fördern. Für die anschließende Inkubation mit LH bzw. hCG wurde in einem Versuch serumhaltiges (Abb. 3A-B) in einem weiteren serumfreies Medium (Abb. 4A-B) verwendet.

Die beschriebenen Voruntersuchungen wurden jeweils an Zellkulturen aus Corpora lutea der frühen (Abb. 3A, 4A) und der späten Anbildungsphase (Abb. 3B, 4B) ausgeführt. Eine dosisabhängige Stimulierbarkeit der Progesteronsekretion mit LH bzw. hCG war nur in serumfreiem Medium erkennbar (Abb. 4A-B). Wurde die Inkubation in serumhaltigem Medium durchgeführt, so lagen die entsprechenden Progesteronwerte zwar wesentlich höher, jedoch ließ sich mit zunehmender Hormondosis keine eindeutig zunehmende Progesteronsekretion nachweisen (Abb. 3A-B). Gemeinsam ist den Versuchen mit serumfreiem Medium, daß nach einer 24-stündigen Inkubation mit hCG oder LH - sowohl nach 12- als auch nach 24-stündiger Vorinkubation - in der Regel höhere Progesteronwerte vorlagen, als nach einer 12-stündigen Inkubation. Daraus war zu schließen, daß nach einer Inkubationsdauer von 12 Stunden noch keine Hemmung der Sekretion durch das bereits sezernierte Progesteron erfolgte. Aus diesem Grund bot sich dieser Inkubationszeitraum für weitere, vergleichende Untersuchungen zur Progesteronsekretion verschiedener Corpora lutea in der Zellkultur an.

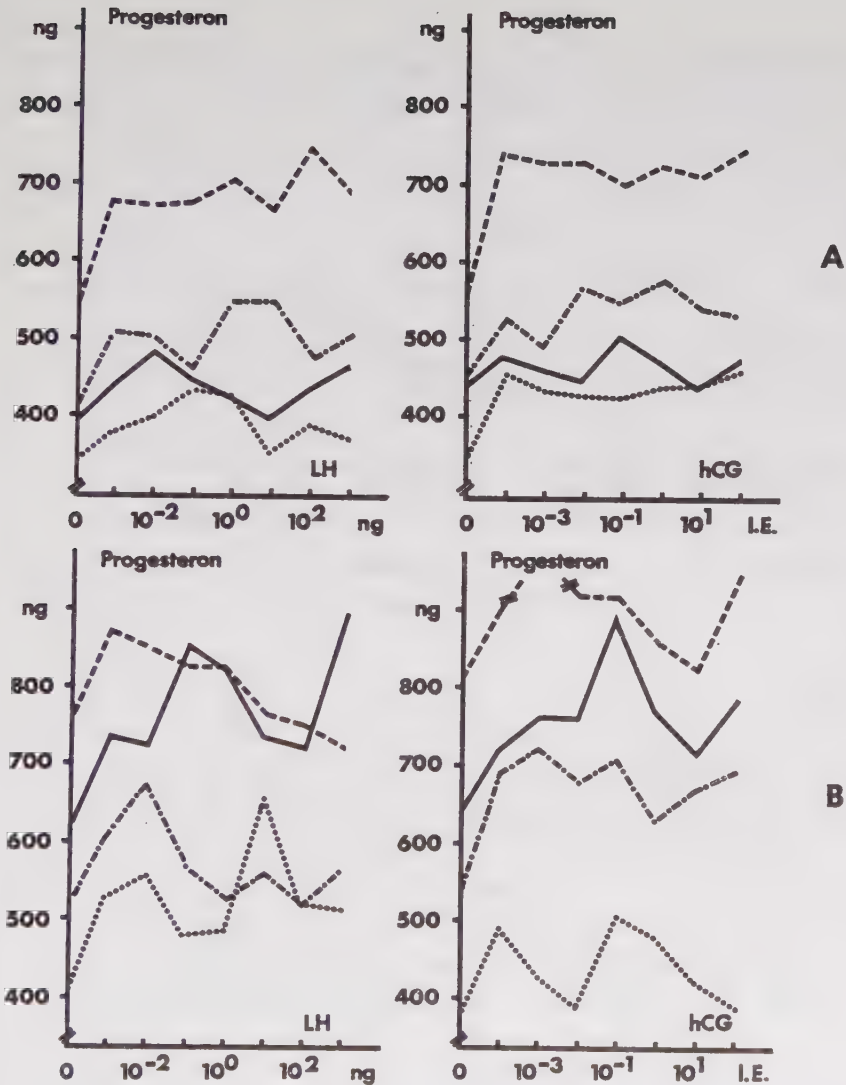


Abb. 3A-B: Dosisabhängige Stimulation der Progesteronsekretion (ng/Kultur) von Luteinzellkulturen (10^5 Zellen) mit LH bzw. hCG (ng bzw. I.E./Kultur) bei unterschiedlicher Vorinkubations- und Inkubationsdauer in serumhaltigem Medium

A: Corpus luteum der frühen Anbildungsphase
B: Corpus luteum der späten Anbildungsphase

— Vorinkubation 12 Std., Inkubation 12 Std.
--- Vorinkubation 12 Std., Inkubation 24 Std.
..... Vorinkubation 24 Std., Inkubation 12 Std.
-.-.- Vorinkubation 24 Std., Inkubation 24 Std.

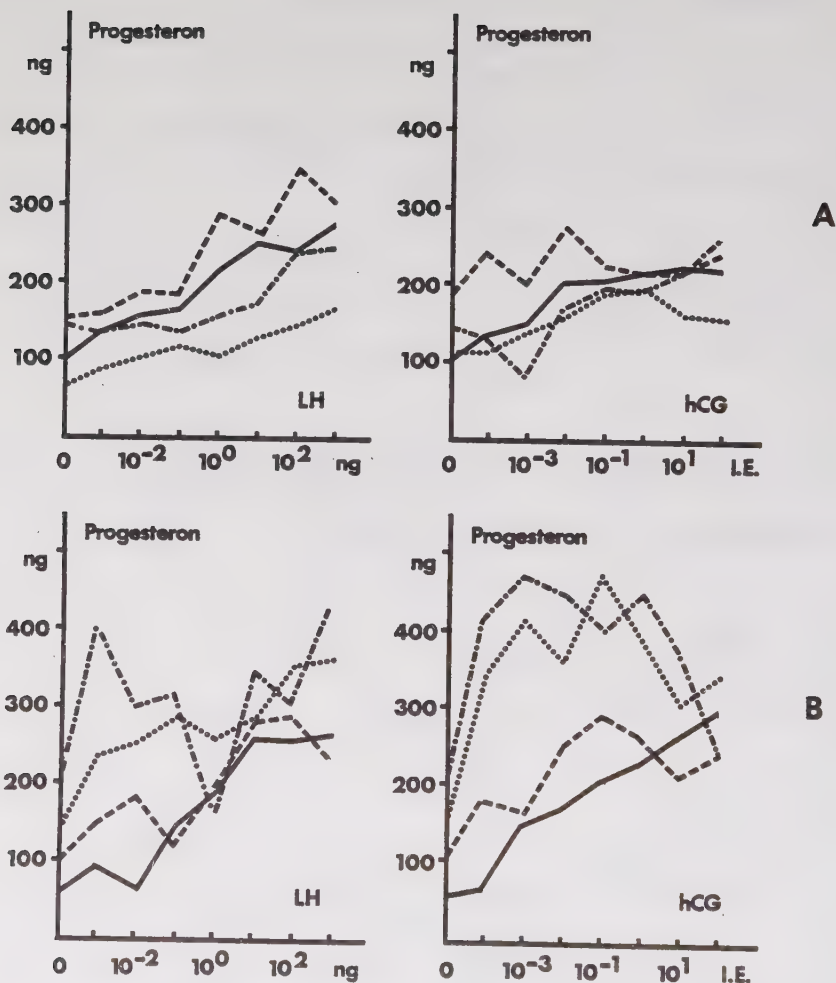


Abb. 4A-B: Dosisabhängige Stimulation der Progesteronsekretion (ng/Kultur) von Luteinzellkulturen (10⁵ Zellen) mit LH bzw. hCG (ng bzw. I.E./Kultur) bei unterschiedlicher Vorinkubations- und Inkubationsdauer in serum-freiem Medium

A: Corpus luteum der frühen Anbildungsphase

B: Corpus luteum der späten Anbildungsphase

— Vorinkubation 12 Std., Inkubation 12 Std.

- - - Vorinkubation 12 Std., Inkubation 24 Std.

..... Vorinkubation 24 Std., Inkubation 12 Std.

- · - · - Vorinkubation 24 Std., Inkubation 24 Std.

Auch die Vorinkubation wurde auf 12 Stunden beschränkt, da nach dieser Zeit die Zellen bereits gut am Gefäßboden anhaften (vgl. Abb. 5a und 5b) und die Inkubation so früh als möglich nach der Aussaat erfolgen sollte, damit keine wesentliche Zellvermehrung (Abb. 5c und 5d) eintritt, die sich auf die Progesteronsekretion auswirken könnte. Um eine dosisabhängige, hormonelle Stimulierbarkeit aufzeigen zu können, wurde im folgenden die Inkubation der Zellkulturen in serumfreiem Medium vorgenommen.

3.2.6.2. Standardisierung des Verfahrens

3.2.6.2.1. Zellaussaat und Kulturbedingungen

Um die jeweilige Zellsuspension mit mehreren Hormonen gleichzeitig inkubieren zu können, wurden Gewebekulturschalen mit 96 Einzelkulturen und einer Fläche von nur $0,32 \text{ cm}^2$ pro Kultur verwendet (Costar 96-well tissue culture clusters, with feat bottom wells, Nr. 3596, Cambridge, Mass. USA).

Nur Zellsuspensionen, deren Vitalitätsrate über 75 % lagen, wurden zur Kultivierung herangezogen und vor der Aussaat mit serumhaltigem Medium auf 6×10^5 intakte Zellen/ml verdünnt. Pro Kultur wurden 150 μl serumhaltiges Medium und 50 μl der Zellsuspension einpipettiert. Somit lagen ca. 30 000 Zellen in 200 μl Medium pro Kultur vor. Nach der Zellaussaat wurden zunächst alle Kulturen im Brutschrank (+ 37°C) 12 Stunden lang bebrütet. Im An-



Abb. 5a: Luteinzellkultur, 6 Stunden nach der Aussaat
Vergrößerungsfaktor: $10 \times 10 \times 0,32$
(Objektiv $\times$ Okular $\times$ Tubusfaktor)

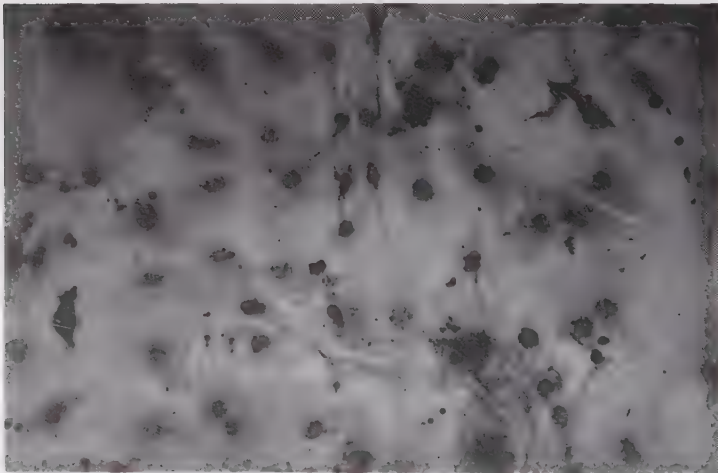


Abb. 5b: Luteinzellkultur, 12 Stunden nach der Aussaat
Masson-Trichrom-Färbung;
Vergrößerungsfaktor: $16 \times 1,25 \times 3,2$
(Objektiv $\times$ Optovar $\times$ Projektiv)

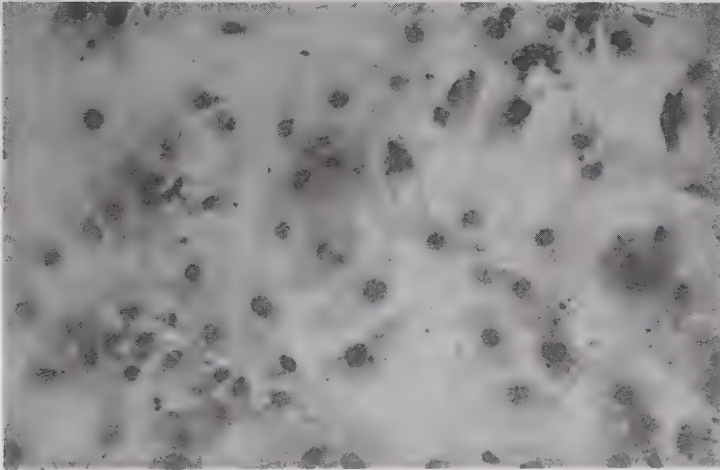


Abb. 5c: Luteinzellkultur, 24 Stunden nach der Aussaat
Masson-Trichrom-Färbung;
Vergrößerungsfaktor: $16 \times 1,25 \times 3,2$
(Objektiv x Optovar x Projektiv)

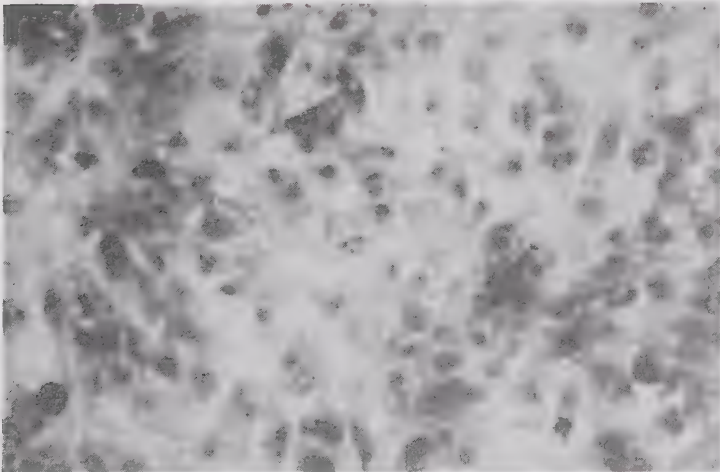


Abb. 5d: Luteinzellkultur, 48 Stunden nach der Aussaat
Masson-Trichrom-Färbung;
Vergrößerungsfaktor: $16 \times 1,25 \times 3,2$
(Objektiv x Optovar x Projektiv)

schluß an diese Vorinkubation wurde das Medium abgesaugt und verworfen und der verbleibende Zellrasen (Abb. 5b) zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen. Für die nachfolgende Inkubation wurden den Kulturen entweder 100 µl serumfreies Medium und 100 µl serumfreies Medium mit der zu untersuchenden Hormonkonzentration (s. Kap. 3.2.6.2.2.) oder 200 µl serumfreies Medium (Kontrollkulturen) zugegeben. Nach einer Inkubation von 12 Stunden wurde das Inkubationsmedium der Kulturen entfernt und bis zur radioimmunologischen Progesteronbestimmung bei -20°C aufbewahrt.

3.2.6.2.2. Zugabe von Hormonen

Eine bestimmte Menge des jeweiligen Hormones wurde in einem dafür geeigneten Vehikel gelöst. Von dieser Stammlösung wurde mit serumfreiem Medium eine logarithmische Verdünnungsreihe mit insgesamt 7 Verdünnungsstufen hergestellt (Tab. 3a, 3b).

Pro Kulturschale konnten 2 Hormone mit je einer Kontrolle und 7 Verdünnungsstufen im 6-fachen Ansatz getestet werden (Abb. 6). Bei einer geringeren Zellausbeute wurde z.T. nur ein 4- oder 3-facher Ansatz getestet. Durch diese Versuchsanordnung konnten daher pro Kulturschale anstelle von 2 Hormonen, wie in Abb. 6 dargestellt, 3 bzw. 4 Hormone verwendet werden.

Hormon 1						Hormon 2						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
												A Kontrolle
												B Hormonkonz. 1
												C Hormonkonz. 2
												D Hormonkonz. 3
												E Hormonkonz. 4
												F Hormonkonz. 5
												G Hormonkonz. 6
												H Hormonkonz. 7

Abb. 6: Beschickung der Kulturschale (Costar 96-well tissue culture clusters) mit verschiedenen Hormonkonzentrationen (Tab. 3a, 3b) - schematisch
Hormonkonz. 1: niedrigste Konzentration
Hormonkonz. 7: höchste Konzentration

Die Versuchsplanung ging davon aus, nicht Absolutwerte von verschiedenen Kulturaussaaten zu erfassen, sondern in einer Zellsuspension von einem Corpus luteum möglichst den Effekt aller in Tab. 3a und 3b aufgeführten Hormone vergleichend, d.h. in erster Linie relativ zu bestimmen. Dadurch sollte eine Beeinflussung der Ergebnisse durch unterschiedliche Vitalität der Zellen und unterschiedliches Zellwachstum u.ä. vermieden werden.

Aus den Tabellen 3a und 3b (s. Seite 52, 53) ist ersichtlich, daß zur Herstellung der Hormonstammlösungen verschiedene Lösungsmittel erforderlich waren. Die Haltbarkeit von gelöstem LH und Prolaktin bei -20°C wird mit 2 bzw. 1 Woche angegeben, so daß Stammlösungen, die länger tiefgefroren waren, nicht mehr benützt wurden. Von den in 70 %igem Äthanol gelösten Steroiden und Prostaglandinen wurden nur Stammlösungen verwendet, die maximal 2 Monate tiefgefroren waren. Der Volumenanteil des 70 %igen Äthanol im Medium der Zellkulturen lag bei $5 \times 10^{-1} \%$ (Verdünnung 7) bzw. $5 \times 10^{-7} \%$ (Verdünnung 1). Ekluton^R, Orasthin^R und Oxytozin (Sigma Chemicals) wurden direkt in serumfreiem Medium 199 gelöst und stets frisch angesetzt (Tab. 3a und 3b).

3.2.7. Entnahme und Aufbewahrung der Kulturmedien

Das Medium jeder Kultur (200 μl) wurde nach der Inkubation mit einer Eppendorfpipette (200 μl) entnommen und in Polypropylenröhrchen (Titertek^R Micronic III Aufbewahrungssystem, Flow Laboratories, Rockville MD USA) bei -20°C gelagert.

3.2.8. Progesteronbestimmung im Kulturmedium

Die Progesteronbestimmung erfolgte mit dem Radioimmunoassay nach HOFFMANN (1972).

Da in den gewonnenen Kulturmedien erheblich höhere Progesteronkonzentrationen als im Blutplasma zu erwarten waren, mußten zunächst geeignete Verdünnungsstufen und Probenvolumina ermittelt werden.

Dazu wurden Proben mit 4000, 1000, 500, 200, 100 und 10 ng Progesteron pro ml Medium hergestellt. Von jeder dieser Proben wurde mit RSA- (Rinderserumalbumin) -Puffer eine logarithmische Verdünnungsreihe bis zur Verdünnung von 1 : 10 000 angesetzt. Für die radioimmunologische Bestimmung wurden von jeder Verdünnungsstufe Probenvolumina von 50, 100 und 200 µl herangezogen. Die Progesteronbestimmungen erfolgten im dreifachen Ansatz jeweils mit und ohne vorherige Extraktion des Progesterons.

Bei Proben mit Konzentrationen von 200, 500 und 1000 ng/ml, also den Konzentrationen, die u.a. in den Zellkulturmedien zu erwarten waren, erwies sich eine Verdünnung von 1 : 100 und ein Probenvolumen von 100 µl als günstigste Kombination. Die Progesteronwerte mit und ohne Extraktion zeigten keinen wesentlichen Unterschied (Tab. 4).

Im folgenden wurden daher die Zellkulturmedien anhand eines Digital-Diluters (Fa. Hamilton) 1 : 100 mit RSA-Puffer verdünnt. Von den verdünnten Proben wurden 100 µl für den Radioimmunoassay herangezogen. Alle Progesteronbestimmungen erfolgten direkt, d.h. ohne vorherige Extraktion des Progesterons. Nachdem die Ergebnis-

Tab. 4: Einfluß der Extraktion auf die Wiederfindung von nicht markiertem Progesteron.

Probenverdünnung 1:100, Probenvolumen 100 µl

Zusatz Progesteron	gemessenes Progesteron (ng/100µl)	
	mit Extraktion	ohne Extraktion
200 ng/ml	0,16	0,16
	0,12	0,18
	0,16	0,20
500 ng/ml	0,34	0,38
	0,30	0,42
	0,34	0,48
1000 ng/ml	1,30	0,98
	1,20	0,88
	1,34	1,00

se aus Doppelbestimmungen nur geringfügig von denen aus Einzelbestimmungen abweichen, wurden alle Proben im einfachen Ansatz bestimmt (Abb. 7).

Um die Reproduzierbarkeit und die Genauigkeit des Radioimmunoassays zu überprüfen, wurden mehrmals 2 Kontrollproben mit Konzentrationen von 200 und 500 ng Progesteron/ml Medium im 3-fachen Ansatz mitbestimmt (Tab. 5).

Anhand dieser Proben konnten für die Variationskoeffizienten (s %) der Interassay-Variation Werte von 1,2 - 16,1 %, für den der Intraassay-Variation Werte von 2,0 - 18,6 % ermittelt werden (Tab. 5). Die Wiederfindung der Kontrollen lag bei durchschnittlich 101 % (200 ng) und 106 % (500 ng).

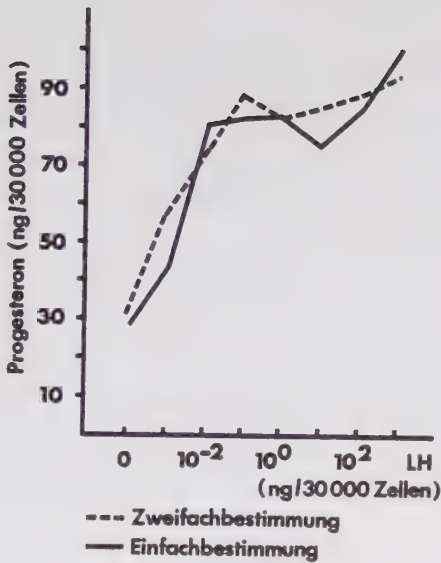


Abb. 7: Progesteronwerte in den Kulturmedien nach Stimulation der Zellkulturen mit LH: Vergleich der Ergebnisse zwischen Einfach- und Doppelbestimmungen im Radioimmunoassay

3.2.9. Progesteronbestimmung im Blutserum

Die Blutproben wurden bei + 4°C mit 2000 g 15 Minuten zentrifugiert und anschließend bei -20°C aufbewahrt. Die Progesteronbestimmung wurde mit Extraktion der Proben nach dem von HOFFMANN (1972) beschriebenen Verfahren durchgeführt.

Tab. 5: Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Progesteronbestimmung: wiederholte Messung von Proben mit 200 und 500 ng nicht markiertem Progesteron/ml Medium
Probenverdünnung 1:100, Probenvolumen 100 μ l

Zusatz ng Progesteron pro ml Medium	Test	Inter- Assay- Variation	Gemessener Progesteronwert (ng/ml Medium)				Intra-Assay-Variation	
			Wert 1	Wert 2	Wert 3	x	s	s %
200	1		201,00	213,70	185,10	199,9	14,3	7,1
	2		221,25	207,00	197,00	208,4	12,1	5,8
	3		214,95	208,90		211,9	4,2	2,0
	4		220,95	209,20	234,60	221,1	12,7	5,7
	5		208,60	212,30	262,90	227,9	30,3	13,3
			x	213,3	210,2	219,9		
			s	8,6	2,7	35,5		
			s %	4,0	1,2	16,1		
500	1		460,90	468,10	438,10	455,7	15,6	3,4
	2		596,90	495,50	554,60	549,0	50,9	9,2
	3		552,20	423,50		487,8	91,0	18,6
	4		549,20	565,60	507,00	540,6	30,2	5,5
	5		535,10	507,00	487,40	509,8	23,9	4,7
			x	538,8	491,9	496,7		
			s	49,3	52,2	48,2		
			s %	9,1	10,6	9,7		

3.2.10. Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden die Ergebnisse für die elektronische Datenverarbeitung aufbereitet und auf Lochkarten übertragen. Folgende statistische Verfahren wurden eingesetzt: Varianzanalyse, t-Test, Regressionsanalyse (WEBER 1972). Für die Berechnungen mit Prozentzahlen wurden transformierte Werte (angular transformation) herangezogen (ROHLF und SOKAL 1969).*

* Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. K. Osterkorn vom Institut für Tierzucht und Tierhygiene der Universität München

3.3. Untersuchungen über die Progesteronsekretion von Corpora lutea mit und ohne Hohlraumbildung

3.3.1. Anzüchtbarkeit der dispergierten Luteinzellen

Von den unter 3.1. angegebenen 36 Corpora lutea periodica des Schlachthofmaterials waren insgesamt 25 kultivierbar (Tab. 6).

Bei 5 der am Schlachthof gesammelten Corpora lutea periodica, 3 mit und 2 ohne Hohlraumbildung, die makroskopisch in die Regressionsphase eingestuft worden waren, lag die Vitalitätsrate der dispergierten Zellen unter 20 % (Tab. 7). Da die Progesteronkonzentrationen im Blutserum dieser Tiere weniger als 1 ng/ml betrug, wurde die erfolglose Zelldispergierung von Corpora lutea der Regressionsphase darauf zurückgeführt, daß das Luteingewebe solcher Gelbkörper bereits in vivo nicht mehr endokrin aktiv war und einen hohen Prozentsatz an degenerierten Luteinzellen enthielt.

Von 6 Corpora lutea periodica des Schlachthofmaterials, von denen makroskopisch 2 der späten Anbildungsphase (ohne Hohlraum) und 4 der Blütephase (davon ein Corpus luteum mit Hohlraum) zugeordnet wurden (Tab. 6), waren nur Zellsuspensionen zu gewinnen, deren Vitalitätsrate unter 75 % lag. Die hier gemessenen Progesteronwerte (>1 ng/ml Blutserum) wiesen auf endokrin aktive Gelbkörper hin. Für die erfolglose Zelldispergierung schien nicht das Ausgangsmaterial, sondern ein methodischer Faktor verantwortlich gewesen zu sein.

Tab. 6: Anzahl der Corpora lutea periodica und Anzüchtbarkeit ihrer dispergierten Luteinzellen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium und der Hohlraumbildung (Schlachthofmaterial)

Untersuchungs- material	Entwicklungsstadium				Total
	I	II	III	IV	
Corpora lutea mit Hohlraumbildung	-	5	5(1)	0(3)	10(4)
Corpora lutea ohne Hohlraumbildung	4	4(2)	7(3)	0(2)	15(7)
Total					25(11)

I = frühe Anbildungsphase III = Blütephase
 II = späte Anbildungsphase IV = Rückbildungsphase
 () Zahl in Klammern = Corpora lutea mit nicht
 anzüchtbaren Zellen

Von den restlichen 25 Corpora lutea periodica des Schlachthofmaterials (Tab. 6) wurden 2 Corpora lutea der Blütephase (ohne Hohlraumbildung) bei den Ergebnissen nicht berücksichtigt. Der pH-Wert der Medien stieg bei diesen Versuchen im Verlauf der Kultivierung stark an (pH 8,5). Es konnte nicht ausgeschlossen werden, daß dadurch die Fähigkeit der Zellen zur Progesteronsekretion ungünstig beeinflußt wurde.

Unter Einbeziehung von 2 Corpora lutea graviditatis und 2 Corpora lutea ovariektomierter Tiere, deren Zellen eine gute Kultivierbarkeit zeigten, ergaben sich somit 27 Corpora lutea, die für die Untersuchungen verwendet werden konnten. Zwei davon (frühe und späte Anbildungsphase) wurden zu den Voruntersuchungen in serum-

Tab. 7: Vergleich der Vitalitätsraten ($\%$; $\bar{x} \pm s_x$) zwischen dispergierten Luteinzellen aus Corpora lutea mit und ohne Hohlraumbildung verschiedener Entwicklungsstadien
Zahlen in Klammern: Anzahl der Corpora lutea

	späte Anbildungsphase		Blütephase		Regressionsphase	
	ohne Hohlraum	mit Hohlraum	ohne Hohlraum	mit Hohlraum	ohne Hohlraum	mit Hohlraum
späte Anbildungsphase ohne Hohlraum	-	* 81,2 + 2,16 (5)	n.s. 81,4 + 2,37 (8)	n.s. 84,2 + 3,18 (5)	** 12,7 + 0,70 (2)	** 10,2 + 2,80 (3)
späte Anbildungsphase mit Hohlraum	-	-	n.s.	*	**	**
Blütephase ohne Hohlraum			-	n.s.	**	**
Blütephase mit Hohlraum				-	**	**
Regressionsphase ohne Hohlraum					-	n.s.
Regressionsphase mit Hohlraum						-

t-Test: n.s. = $P > 0.05$
 * = $P \leq 0.05$
 ** = $P \leq 0.01$

nicht berücksichtigt: 6 Corpora lutea, die aus methodischen Gründen ausfielen;
 4 Corpora lutea der frühen Anbildungsphase; 2 Corpora lutea graviditatis

haltigem Medium herangezogen (Abb. 3A-B). Bei allen untersuchten Kühen (ca. 100 Tiere) waren keine Corpora lutea der frühen Anbildungsphase mit Hohlraumbildung zu finden. Die Ergebnisse der kompakten Gelbkörper desselben Zyklusstadiums (siehe Tab. 6) konnten daher nicht Corpora lutea mit Hohlraumbildung gegenübergestellt werden; ihre Werte bleiben in den folgenden Besprechungen unberücksichtigt. Für den Vergleich von Corpora lutea periodica mit und ohne Hohlraumbildung stehen deshalb insgesamt 20 Corpora lutea der späten Anbildungs- und der Blütephase zur Verfügung (Abb. 8).

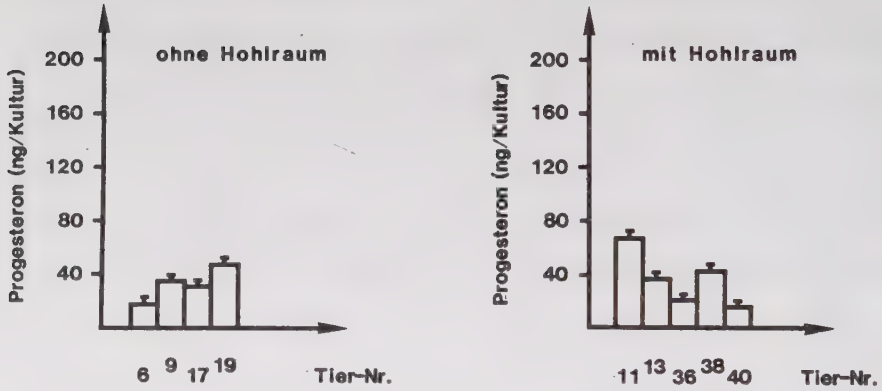
Die Ergebnisse aus Zellkulturen der beiden Corpora lutea graviditatis werden in Kapitel 3.3.2.2.2. besprochen.

3.3.2. Einfluß der Hohlraumbildung auf die Progesteronsekretion

3.3.2.1. Basale Progesteronsekretion

Innerhalb der hier untersuchten Entwicklungsstadien des Corpus luteum (späte Anbildungsphase, Blütephase) war kein Einfluß der Hohlraumbildung auf die basale Progesteronsekretion nachzuweisen. Sowohl in der späten Anbildungsphase, als auch in der Blütephase bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Basalsekretion von Corpora lutea mit und ohne Hohlraumbildung (Tab. 8).

SPÄTE ANBILDUNGSPHASE



BLÜTEPHASE

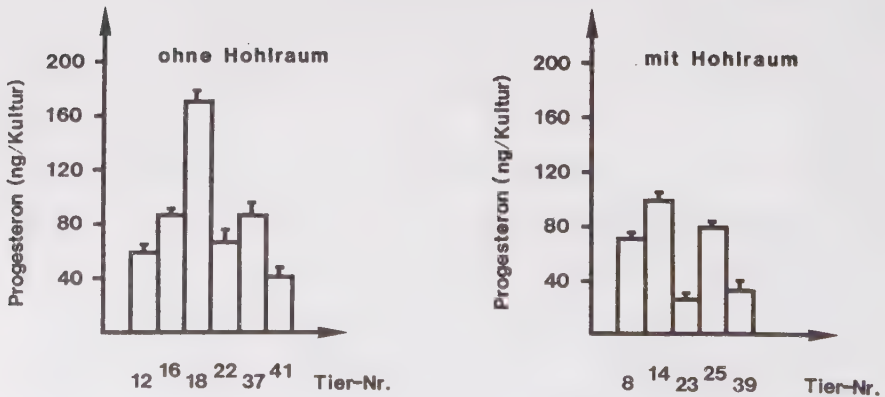


Abb. 8: Einfluß der Hohlraumbildung auf die basale Progesteronsekretion (ng, $\bar{x} \pm s_x$) von Luteinzellkulturen (30000 Zellen) in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Corpora lutea

Tab. 8: Vergleich der basalen Progesteronsekretion (ng, $\bar{x} + s_x$ /Kultur mit 30000 Zellen; Kultivierungsintervall: 12-24 Stunden) zwischen Zellkulturen aus Corpora lutea verschiedener Entwicklungsstadien mit und ohne Hohlraumbildung
Zahlen in Klammern: Anzahl der Corpora lutea

	späte Anbildungsphase		Blütephase	
	ohne Hohlraum (4)	mit Hohlraum (5)	ohne Hohlraum (6)	mit Hohlraum (5)
Basale Progesteronsekretion	34,7 ± 6,40	39,0 ± 9,57	88,6 ± 18,72	63,7 ± 12,80
späte Anbildungsphase ohne Hohlraum	-	n.s.	*	n.s.
späte Anbildungsphase mit Hohlraum		-	*	n.s.
Blütephase ohne Hohlraum			-	n.s.
Blütephase mit Hohlraum				-

t-Test: n.s. = $P > 0.05$
* = $P \leq 0.05$

Im Gegensatz dazu machte sich das Entwicklungsstadium der Corpora lutea bei der basalen Progesteronsekretion deutlich bemerkbar. Die aus der Blütephase des Gelbkörpers stammenden Luteinzellkulturen ließen im Vergleich zu denen der späten Anbildungsphase die Tendenz zu einer intensiveren Basalsekretion erkennen (Abb. 8). Jedoch wiesen nur kompakte Blütegelbkörper eine signifikant höhere Basalsekretion im Vergleich zu den Gelbkörpern der Anbildungsphase auf ($P \leq 0.05$, t-Test; Tab. 8).

Unabhängig vom Entwicklungsstadium und der Hohlraumbildung waren zwischen den einzelnen Corpora lutea innerhalb der 4 verschiedenen Versuchsgruppen erhebliche Variationen in der Höhe der basalen Progesteronsekretion festzustellen (Abb. 8). Auffällig war die hohe Basalsekretion des Corpus luteum, das am 15. Zyklustag per Ovariectomie gewonnen worden war (Abb. 8; Tier Nr. 18), während das entsprechende des 7. Zyklustages keine besonders intensive Sekretion im Vergleich zu den übrigen erkennen ließ (Abb. 8; Tier Nr. 17).

Da nicht auszuschließen war, daß die stark variierenden Basalsekretionen mit unterschiedlichen Vitalitätsraten zusammenhingen, wurde diese Frage gesondert untersucht.

Ein Vergleich der Vitalitätsraten der dispergierten Zellen ergab, daß sich Gelbkörper der Regressionsphase mit durchschnittlich 12,7 % bzw. 10,2 % lebender Zellen ganz erheblich von Corpora lutea der beiden übrigen Zyklusstadien unterscheiden (Tab. 7). In diesen, d.h. in der späten Anbildungs- und in der Blütephase, lagen die durchschnittlichen Vitalitätsraten in der Größenordnung zwischen 76,1 und 84,2 %. Die Unterschiede zwischen Gelbkörpern mit und ohne Hohlraum konnten zwar in der späten Anbildungsphase statistisch abgesichert werden ($P \leq 0,05$), absolut gesehen differierten die Vitalitätsraten zwischen Corpora lutea mit und ohne Hohlraum sowohl innerhalb als auch zwischen den beiden hier untersuchten Zyklusstadien nur unwesentlich.

Ein Zusammenhang zwischen den Vitalitätsraten und der Basalsekretion konnte nicht festgestellt werden. Die Korrelationen zwischen diesen beiden Parametern, die für die Anbildungs- und für die Blütephase berechnet wurden, waren mit $r = 0,006$ bzw. $r = 0,19$ sehr niedrig und nicht signifikant ($P > 0,05$). Die Vitalitätsraten der Zellen aus den Corpora lutea der ovariectomierten Tiere betrugen 75,5 % und 86,3 %, also Werte, die mit solchen des vorher erwähnten Schlachthofmaterials vergleichbar waren.

3.3.2.2. Hormonell induzierte Progesteronsekretion

3.3.2.2.1. Corpora lutea periodica der späten Anbildungsphase und der Blütephase

Da davon ausgegangen wurde, daß sich bei der Stimulierung der Lutetinzellkulturen neben der Hohlraumbildung und dem Entwicklungsstadium der Gelbkörper auch die Dosierung des jeweils verwendeten Hormons auf die Progesteronkonzentrationen auswirkte, wurden die Ergebnisse einer 3-faktoriellen Varianzanalyse mit den Faktoren Hohlraum (ja/nein), Entwicklungsstadium des Corpus luteum (späte Anbildungs- bzw. Blütephase) und Dosierung (0 = Basissekretion, Dosierungsstufen 1-7) einbezogen. Diese Analyse wurde für alle eingesetzten Hormone durchgeführt (Tab. 9).

Tab. 9: 3-faktorielle Varianzanalyse: Vergleich der Progesteronkonzentrationen der Lutein-
zellkulturen in Abhängigkeit von den Faktoren Hohlraum, Entwicklungsstadium des Corpus
luteum und Hormondosierung (angegeben sind die Signifikanzen der F-Werte)

Variabilitäts- ursache	Hormon					
	LH	hCG	Pro- laktin	17 β -Östra- diol	Andro- sterdion	Oxy- tozin
Hohlraum	0,001	0,001	0,001	0,001	0,009	0,052
Entwicklungs- stadium des Corpus luteum	0,001	0,001	0,001	0,004	0,001	0,001
Hormondosis	0,001	0,001	0,786	0,003	0,992	0,968

Es zeigte sich, daß die Hohlraumbildung der Gelbkörper einen negativen Einfluß auf das Ausmaß der hormoninduzierten Progesteronsekretion hat. Die Werte dieser Corpora lutea lagen - von wenigen Ausnahmen abgesehen - unter denen der kompakten Gelbkörper. Diese Feststellung trifft insbesondere für die Fälle zu, in denen die Kulturen mit den Hormonen LH (Abb. 9), hCG (Abb. 10), Prolaktin (Abb. 11), PGE_2 (Abb. 12), Androstendion (Abb. 14) und $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Abb. 15) inkubiert wurden. Die Differenzen waren hier signifikant (Tab. 9). Bei den Corpora lutea, die für die Inkubation mit 17 β -Östradiol und Oxytozin verwendet wurden, konnte diese Beobachtung auch gemacht werden (Abb. 13 bzw. Abb. 16), jedoch waren die Differenzen - vermutlich wegen des kleineren Stichprobenumfanges - statistisch nicht abzusichern (Tab. 9).

Das Entwicklungsstadium der Gelbkörper wirkte sich deutlich auf die Progesteronsekretion der Corpora lutea nach Inkubation mit den bereits erwähnten Hormonen aus. Die Werte der Blütegelbkörper übertrafen die der Corpora lutea aus der Anbildungsphase ohne Ausnahme signifikant (Tab. 9, Abb. 9 bis 16).

Neben den beiden Faktoren Hohlraumbildung und Entwicklungsstadium des Corpus luteum war auch die Hormondosis von Bedeutung. Bei 3 von insgesamt 8 eingesetzten Hormonen konnte ein signifikanter, dosisabhängiger Effekt nachgewiesen werden. Nach Stimulation mit den Hormonen LH, hCG und PGE_2 , für die diese Aussage gilt, war mit zunehmender Dosierung eine Tendenz zu ansteigenden Progesteronkonzentrationen in den Luteinzellkulturen zu verzeichnen (Abb. 9, 10, 12).

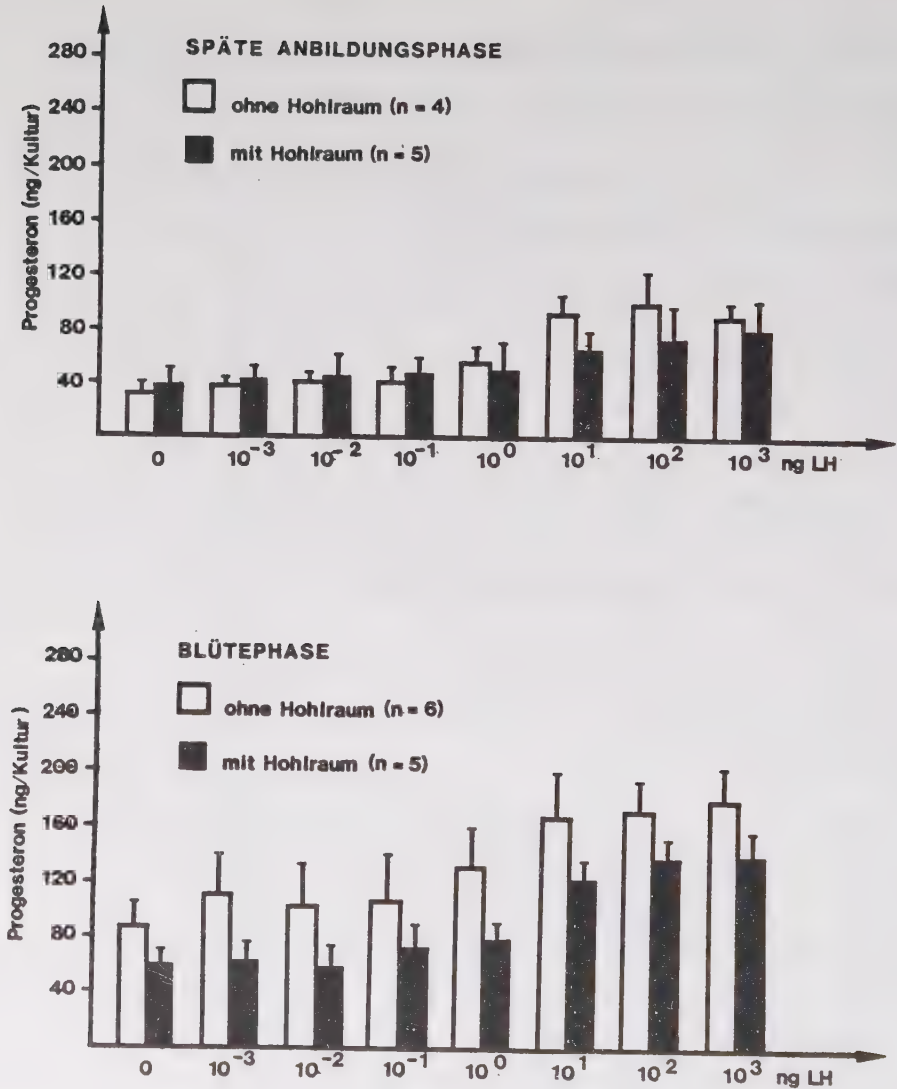


Abb. 9: Einfluß von Hohlraumbildung und Entwicklungsstadium des Corpus luteum sowie der LH-Dosis (ng/Kultur) auf die Progesteronsekretion (ng, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von Luteinzellkulturen (30000 Zellen/Kultur)

Werte in Klammern: Anzahl der untersuchten Corpora lutea

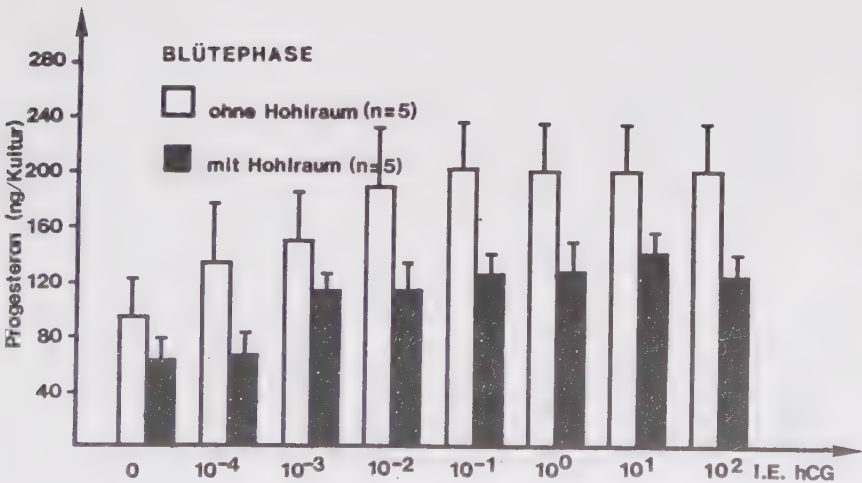
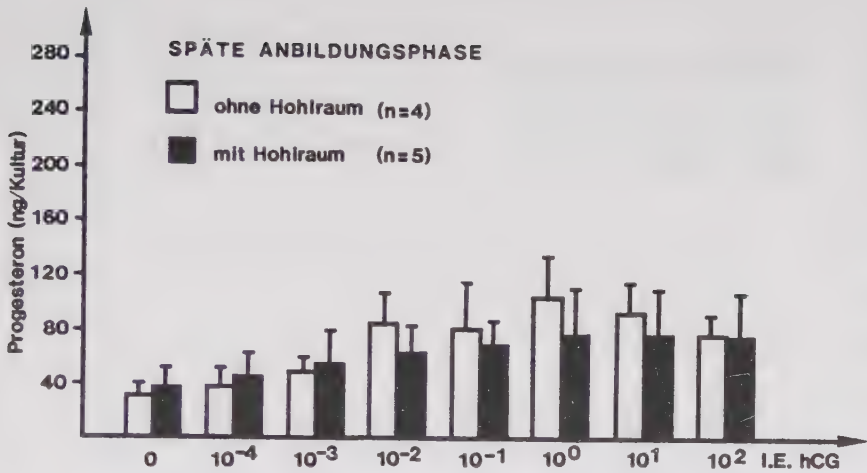


Abb. 10: Einfluß von Hohlraumbildung und Entwicklungsstadium des Corpus luteum sowie der hCG-Dosis (I.E./Kultur) auf die Progesteronsekretion (ng, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von Luteinzellkulturen (30000 Zellen/Kultur)

Werte in Klammern: Anzahl der untersuchten Corpora lutea

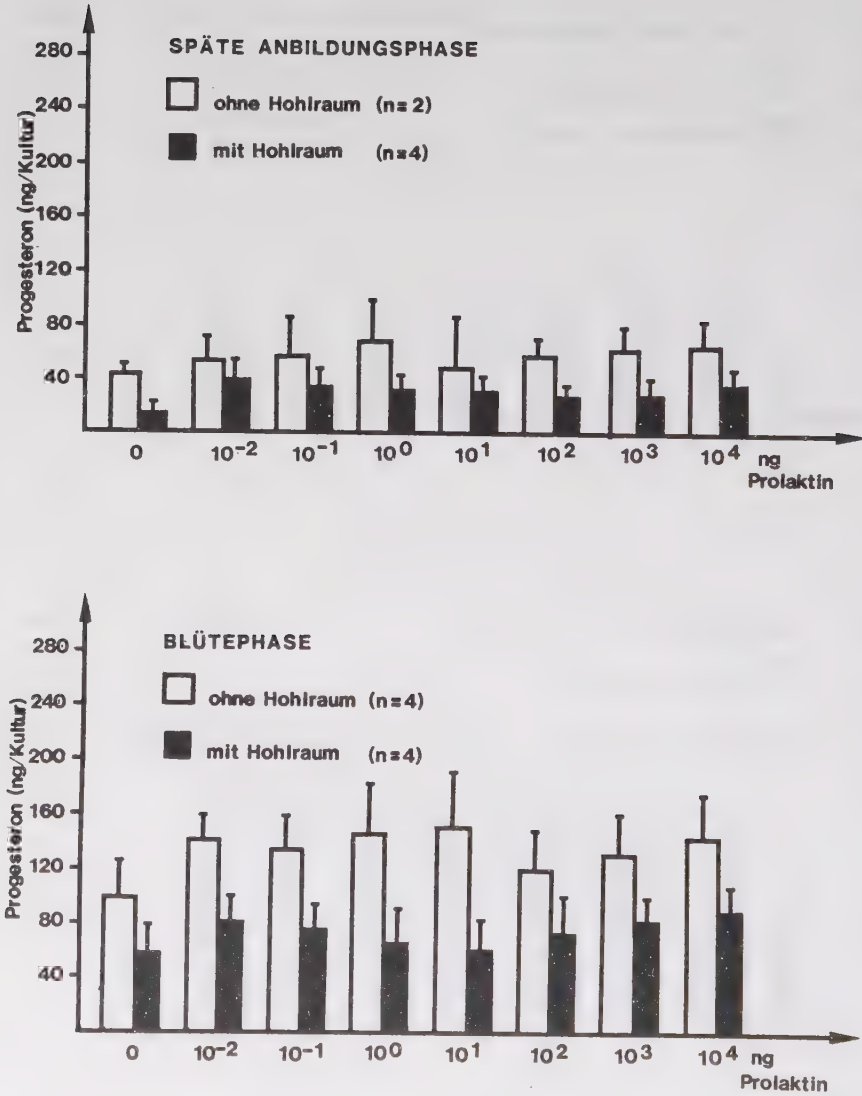


Abb. 11: Einfluß von Hohlraumbildung und Entwicklungsstadium des Corpus luteum sowie der Prolaktin-Dosis (ng/Kultur) auf die Progesteronsekretion (ng, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von Luteinzellkulturen (30000 Zellen/Kultur)
Werte in Klammern: Anzahl der untersuchten Corpora lutea

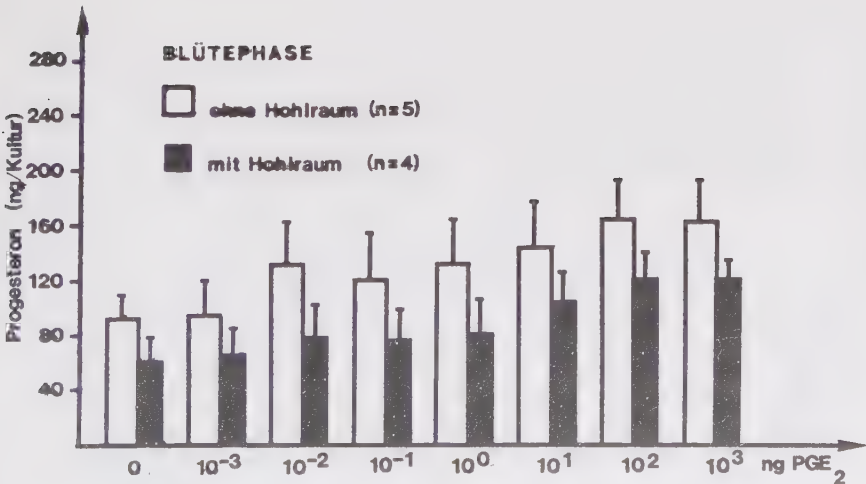
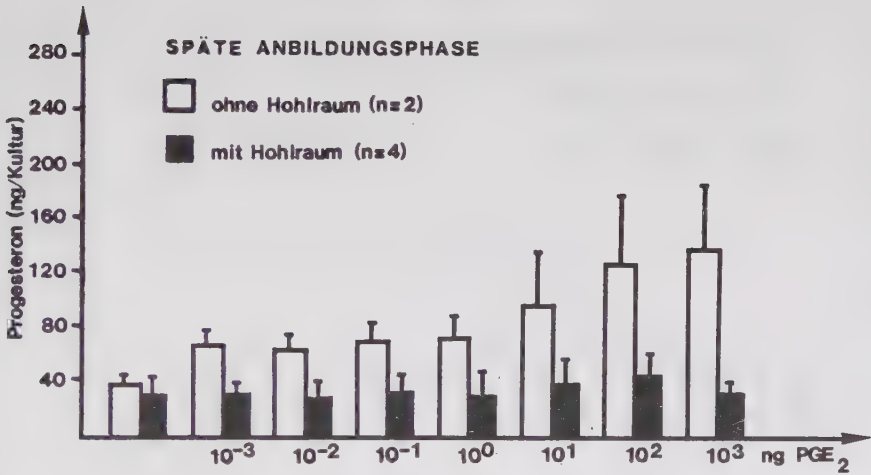


Abb. 12: Einfluß von Hohlraumbildung und Entwicklungsstadium des Corpus luteum sowie der PGE₂-Dosis (ng/Kultur) auf die Progesteronsekretion (ng, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von Luteinzellkulturen (30000 Zellen/Kultur)

Werte in Klammern: Anzahl der untersuchten Corpora lutea

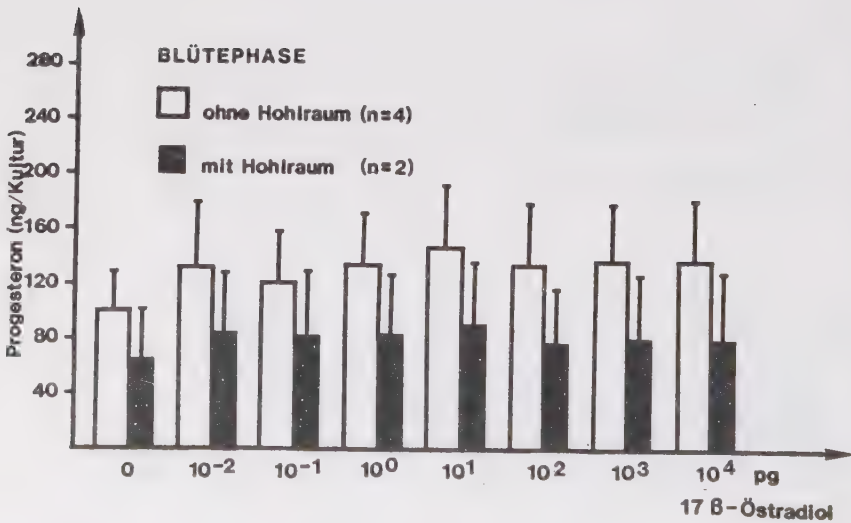
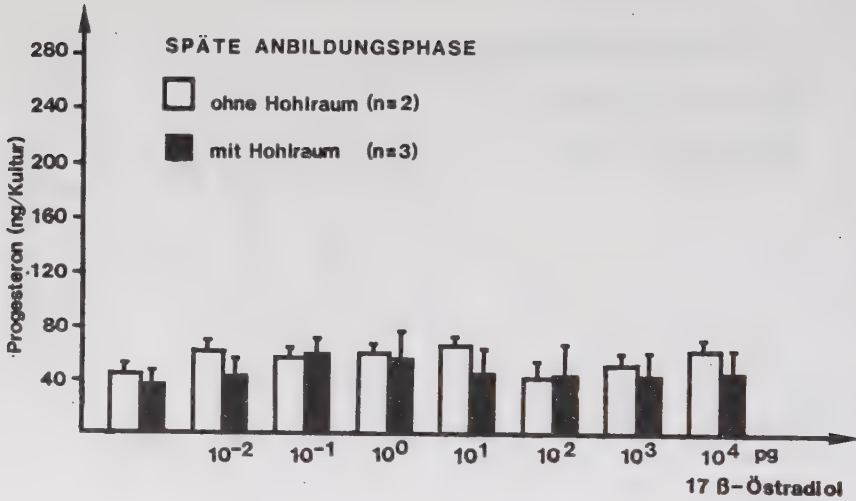


Abb. 13: Einfluß von Hohlraumbildung und Entwicklungsstadium des Corpus luteum sowie der 17β-Östradiol-Dosis (pg/Kultur) auf die Progesteronsekretion (ng, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von Luteinzellkulturen (30000 Zellen/Kultur)
Werte in Klammern: Anzahl der untersuchten Corpora lutea

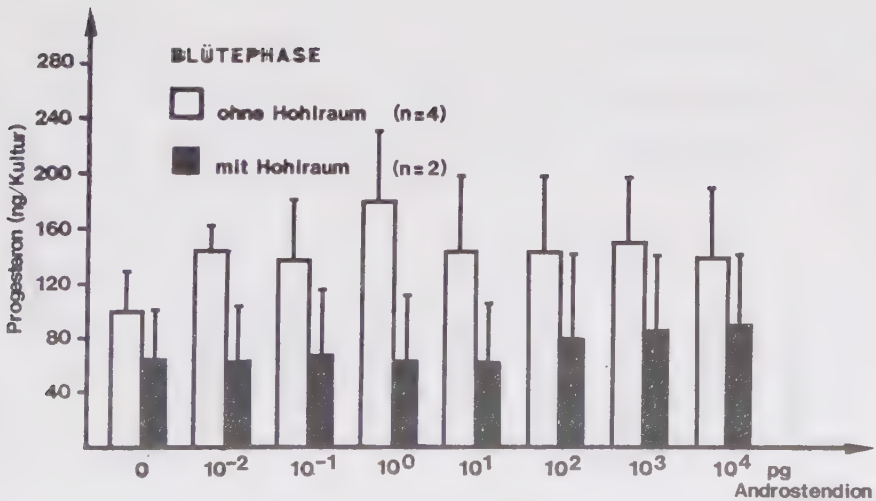
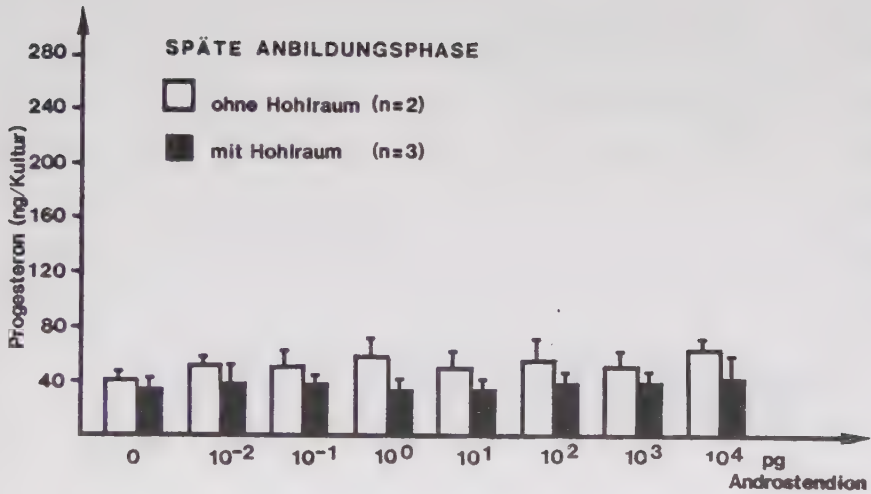


Abb. 14: Einfluß von Hohlraumbildung und Entwicklungsstadium des Corpus luteum sowie der Androstendion-Dosis (pg/Kultur) auf die Progesteronsekretion (ng, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von Luteinzellkulturen (30000 Zellen/Kultur)

Werte in Klammern: Anzahl der untersuchten Corpora lutea

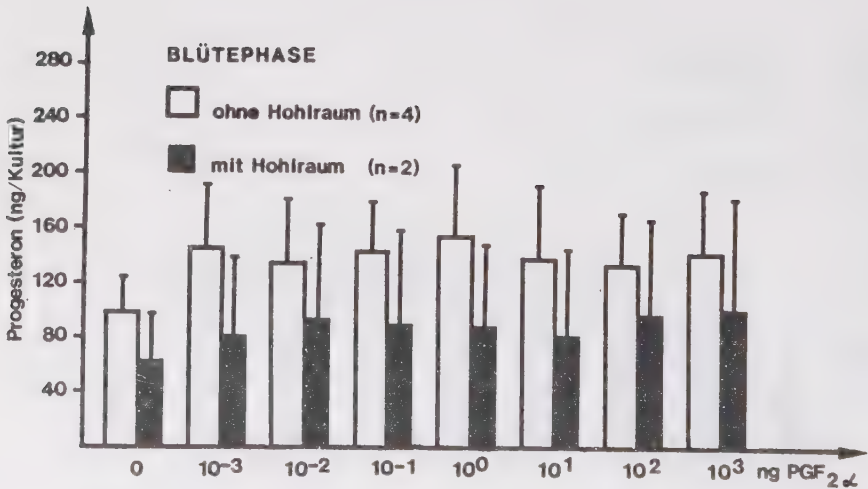
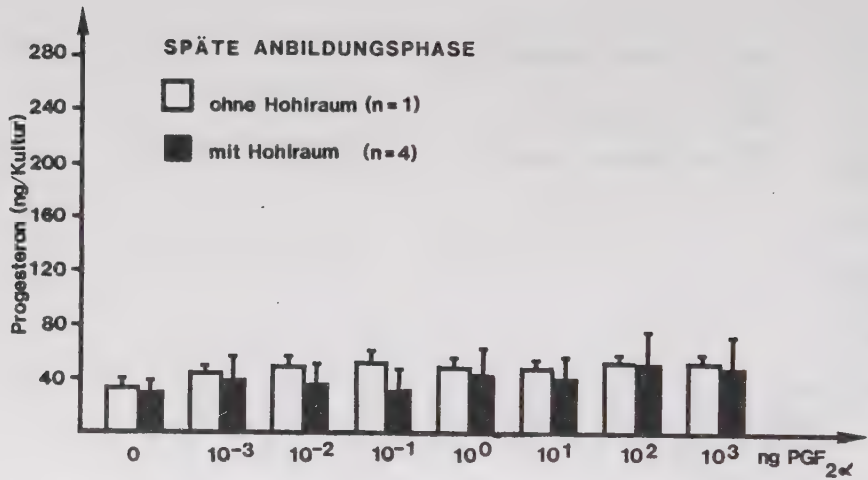


Abb. 15: Einfluß von Hohlraumbildung und Entwicklungsstadium des Corpus luteum sowie der PGF_{2α}-Dosis (ng/Kultur) auf die Progesteronsekretion (ng, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von Luteinzellkulturen (30000 Zellen/Kultur)

Werte in Klammern: Anzahl der untersuchten Corpora lutea

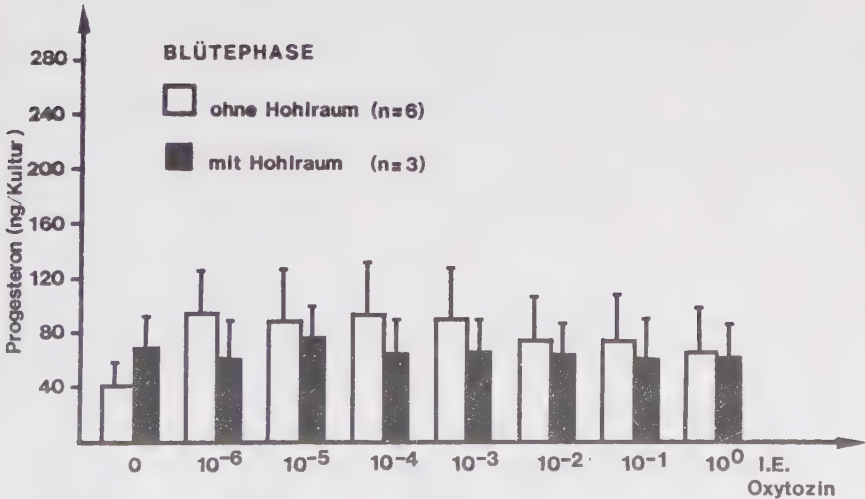
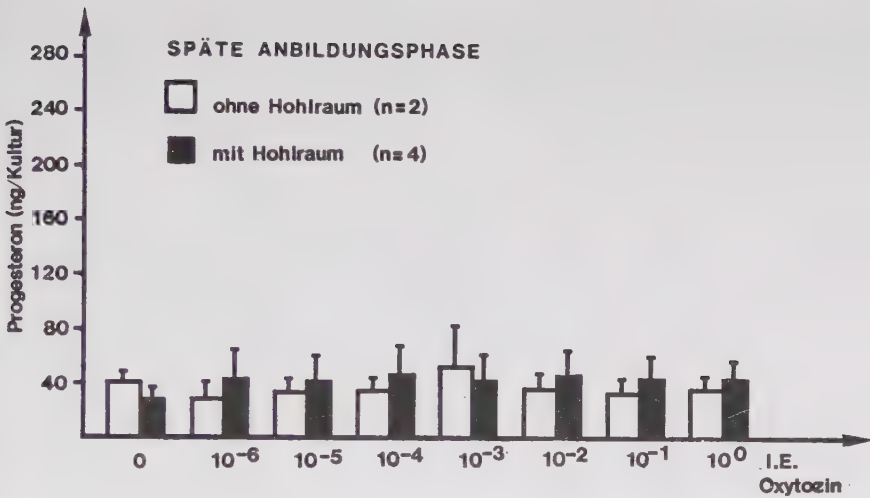


Abb. 16: Einfluß von Hohlraumbildung und Entwicklungsstadium des Corpus luteum sowie der Oxytozin-Dosis (I.E./Kultur) auf die Progesteronsekretion (ng, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von Luteinzellkulturen (30000 Zellen/Kultur)

Werte in Klammern: Anzahl der untersuchten Corpora lutea

Bei den übrigen Hormonen, nämlich Prolaktin, Östradiol, Androstendion, $\text{PGF}_{2\alpha}$ und Oxytozin, konnte kein Einfluß festgestellt werden (Tab. 9, Abb. 11, 13-16).

3.3.2.2.2. Vergleich zwischen der hormonell induzierten Progesteronsekretion von Corpora lutea der Blütephase mit Hohlraumbildung und Corpora lutea graviditatis

Ähnlich wie beim Vergleich von Corpora lutea periodica mit und ohne Hohlraum konnte bei der Gegenüberstellung von Gelbkörpern mit Hohlraumbildung aus der Blütephase und (kompakten) Corpora lutea graviditatis ein dosisabhängiger Effekt bei der Stimulation mit LH, hCG und PGE_2 festgestellt werden (Tab. 10, Abb. 17 und 18). Bei dem ebenfalls eingesetzten Prolaktin war - wie bei den bereits besprochenen Corpora lutea periodica - dieser Zusammenhang nicht gegeben (Tab. 10; Abb. 18). 17β -Östradiol, Androstendion, $\text{PGF}_{2\alpha}$ und Oxytozin wurden hier nicht überprüft.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei den Corpora lutea periodica lagen die Progesteronkonzentrationen der Luteinzellkulturen der Corpora lutea graviditatis im Vergleich zu Gelbkörpern mit Hohlraumbildung aus der Blütephase überwiegend niedriger (Abb. 17 und 18). Die Differenz konnte nur in 2 von 4 Fällen mit Hilfe der 2-faktoriellen Varianzanalyse abgesichert werden (Tab. 10), wobei jedoch der geringe Stichprobenumfang ($n = 2$) zu berücksichtigen ist.

Tab. 10: 2-faktorielle Varianzanalyse: Vergleich der Progesteronkonzentrationen der Luteinzelkulturen von Corpora lutea graviditatis und Corpora lutea periodica mit Hohlraumbildung (Blütephase) in Abhängigkeit von den Faktoren Hohlraum und Hormondosierung (angegeben sind die Signifikanzen der F-Werte)

Variabilitäts- ursache	Hormon							
	IH	hCG	Pro- laktin	PGE ₂	17 β -Östra- diol	Andro- stendion	PGF 2alpha	Oxy- tozin
Hohlraum	0,094	0,681	0,001	0,004	-	-	-	-
Hormondosis	0,001	0,001	0,945	0,015	-	-	-	-

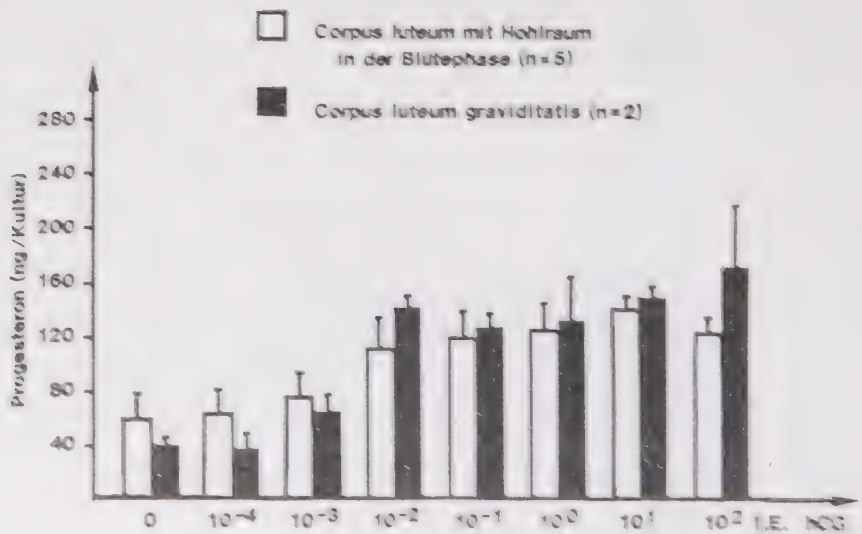
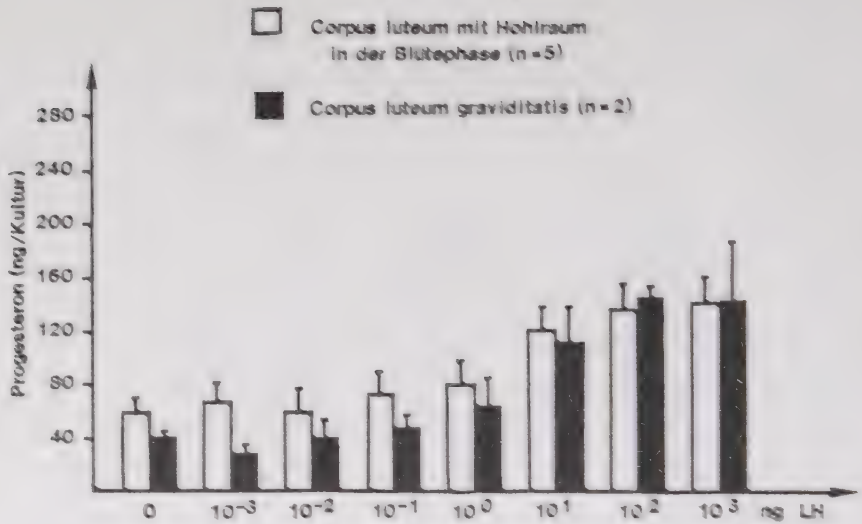


Abb. 17: Gegenüberstellung der LH- und HCG- (ng bzw. I.E.) Kultur-induzierten Progesteronsekretion (ng, $\bar{x} \pm s$) von Zellkulturen ("NOC-Zellen Kultur") aus Corpora lutea der Blütepphase mit Hohlraumbildung und Corpora lutea graviditatis.

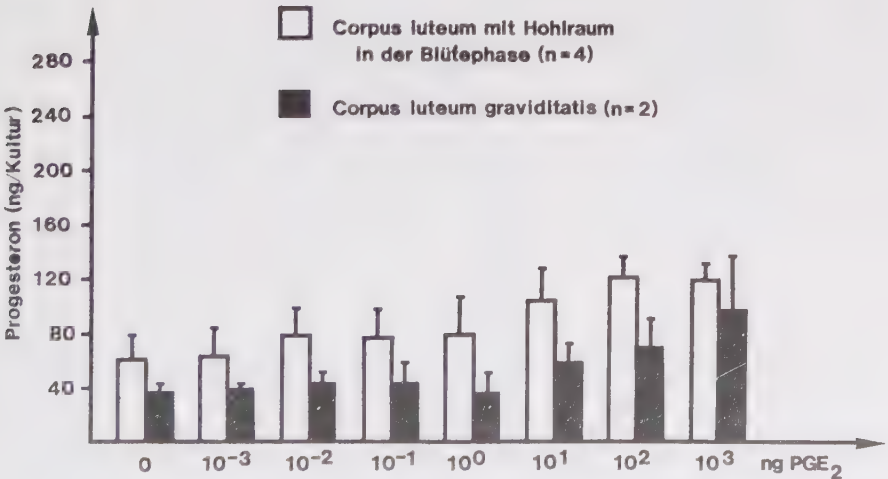
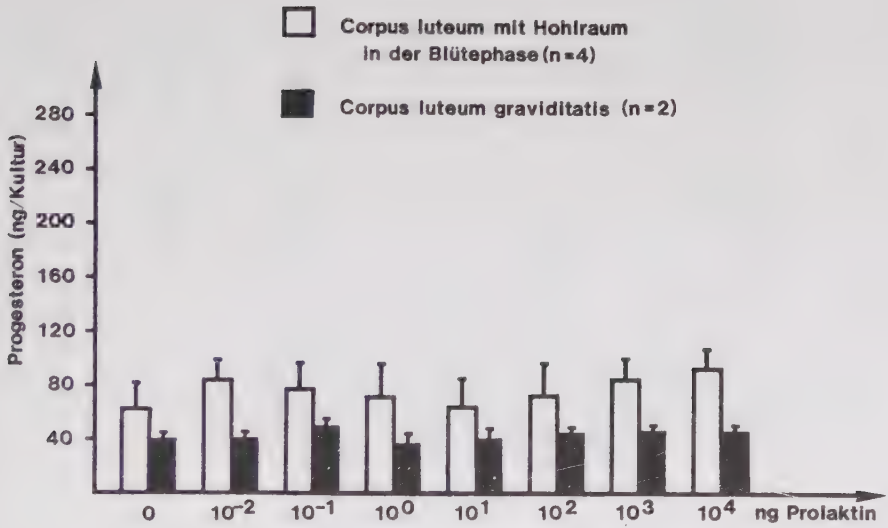


Abb. 18: Gegenüberstellung der Prolaktin- und PGE₂-(ng/Kultur)-induzierten Progesteronsekretion (ng, $\bar{x} + s_{\bar{x}}$) von Zellkulturen (30000 Zellen/Kultur) aus Corpora lutea der Blütephase mit Hohlraumbildung und Corpora lutea graviditatis

3.3.3. Beziehung zwischen der Menge des Hohlraum Inhaltes und der basalen Progesteronsekretion

Der Hohlrauminhalt schwankte bei den 10 untersuchten Corpora lutea zwischen 0,3 und 6 ml (Tab. 11).

Tab. 11: Menge des flüssigen Inhaltes (ml) von Corpora lutea mit Hohlraumbildung verschiedener Entwicklungsstadien
Zahlen in Klammern gleich Tiernummer (vergl. auch Abb. 8)

späte Anbildungsphase			Blütephase		
a)	0,3	(11)	f)	0,3	(25)
b)	0,4	(36)	g)	0,6	(14)
c)	0,8	(13)	h)	2,0	(8)
d)	0,9	(38)	i)	6,0	(23)
e)	1,5	(40)	j)	*	(39)

* kein Inhalt vorhanden

Zwar zeigten in der Anbildungsphase Corpora lutea mit abnehmender Größe des Hohlraumes zunehmende Werte in der basalen Progesteronsekretion (Abb. 19), statistisch ergab sich jedoch kein eindeutiger Zusammenhang ($r = -0,59$; $P > 0.05$). In der Blütephase waren jedoch Menge des flüssigen Hohlraum Inhaltes und basale Progesteronsekretion ($r = -0,95$; $P \leq 0.05$) deutlich negativ korreliert.

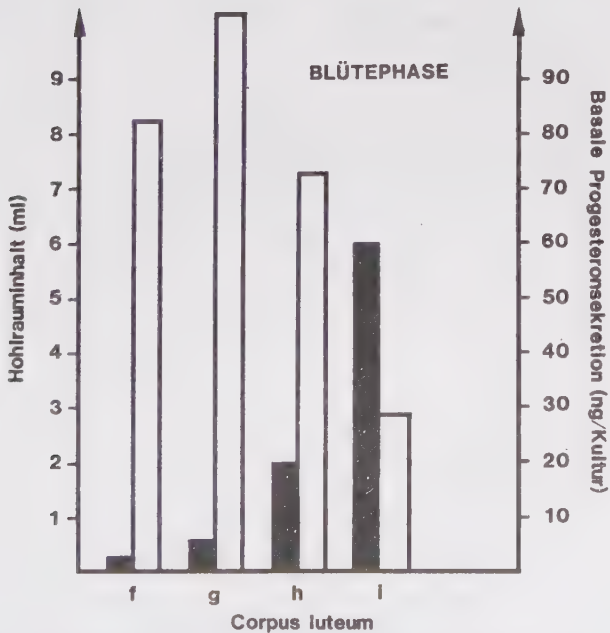
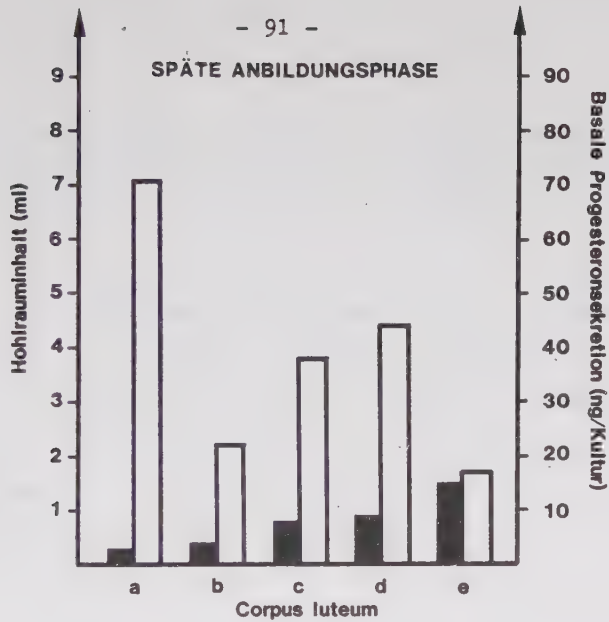


Abb. 19: Beziehung zwischen Menge des Hohlrauminhalt und der basalen Progesteronsekretion aus Luteinzellkulturen (30000 Zellen) von Corpora lutea mit Hohlraumbildung (a bis i) verschiedener Entwicklungsstadien

3.3.4. Beziehung zwischen der basalen Progesteronsekretion der Luteinzellkulturen und der Progesteronkonzentration im Blutserum

Die Progesteronkonzentrationen im Blut der Tiere, deren Corpora lutea zur Zellkultur herangezogen wurden (Abb. 8), unterschieden sich innerhalb der 4 Versuchsgruppen weder zwischen den beiden Entwicklungsstadien noch zwischen Corpora lutea mit und ohne Hohlraumbildung (Tab. 12). Wurden, unabhängig vom Vorhandensein einer Hohlraumbildung, die Werte für jedes Entwicklungsstadium zusammengefaßt, so lagen hier die Progesteronkonzentrationen der Tiere mit Blütegelbkörper ($4,5 \pm 1,61$ ng/ml Serum) über denen der Gruppe mit Anbildungsgelbkörper (mit $3,7 \pm 1,93$ ng/ml Serum; Diff. $P > 0,05$; t-Test).

Ein Zusammenhang zwischen der Progesteronkonzentration im Blutserum und der Basalsekretion der entsprechenden Zellkulturen (Abb. 8) war nicht nachzuweisen ($r = 0,47$, $P > 0,05$).

Tab. 10: Vergleich der Progesteronkonzentration (ng/ml; $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) im peripheren Blutserum von Tieren mit Corpora lutea mit und ohne Hohlraumbildung verschiedener Entwicklungsstadien

Zahlen in Klammern: Anzahl der Corpora lutea

	späte Anbildungsphase		Blütephase	
	ohne Hohlraum (4)	mit Hohlraum (5)	ohne Hohlraum (6)	mit Hohlraum (5)
Progesteron- konzentration	4,0 $\pm$ 1,12	3,4 $\pm$ 0,83	4,8 $\pm$ 0,82	4,0 $\pm$ 0,43
späte Anbildungsphase ohne Hohlraum	-	n.s.	n.s.	n.s.
späte Anbildungsphase mit Hohlraum		-	n.s.	n.s.
Blütephase ohne Hohlraum			-	n.s.
Blütephase mit Hohlraum				-

n.s. = $P > 0.05$ (t-Test)

4. DISKUSSION

Bislang konnte nicht geklärt werden, ob die häufig auftretenden Corpora lutea mit Hohlraumbildung eine dem kompakten Gelbkörper vergleichbare Funktionstüchtigkeit aufweisen. In den Arbeiten, die sich mit dieser Fragestellung beschäftigten, führten weniger die morphologischen als vielmehr die endokrinologischen Untersuchungen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Während manche Autoren Corpora lutea mit Hohlraumbildung eine verminderte endokrine Aktivität zuschreiben (HANSEL 1964, GRUNERT 1969), konnten andere (OKUDA 1982) keine Unterschiede zu kompakten Gelbkörpern feststellen. Die hormonellen Befunde stützen sich vor allem auf Progesteronbestimmungen im Corpus luteum-Gewebe. Da jedoch weniger der Hormongehalt, als vielmehr die Sekretionsleistung die Funktionstüchtigkeit einer endokrinen Drüse charakterisiert, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Progesteronsekretion bei Corpora lutea mit Hohlräumen im Vergleich mit kompakten Gelbkörpern zu überprüfen.

Am lebenden Tier wird allgemein zur Beurteilung der Gelbkörperfunktion das in der Peripherie meßbare Progesteron herangezogen. Bei Corpora lutea mit Hohlraumbildung ist dieses Verfahren jedoch problematisch, da die klinische Diagnose dieser Funktionsgebilde Schwierigkeiten bereitet bzw. von extremen Fällen abgesehen, unmöglich ist. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein In vitro-Modell entwickelt, das einen Vergleich der Sekretionsleistung kompakter und "zystöser" Gelbkörper erlaubt.

Als Methode wurde die Luteinzellkultur gewählt. Sie bietet die Möglichkeit, den intra- und extrazellulären Anteil des Progesterons eindeutig zu trennen und dadurch die Sekretion des Luteingewebes zu messen.

Andere Techniken, wie z.B. die Inkubation von Gewebestücken (ARMSTRONG und BLACK 1966, HANSEL 1966, CONDON 1975, CONDON und PATE 1981) oder von Zellsuspensionen (WILLIAMS und MARSH 1978a, 1978b, WESTON und HIXON 1980, DAVIS et al. 1981), waren für die Überprüfung dieser Fragestellung nicht geeignet. Mit diesen Verfahren ist die Sekretionsleistung entweder nur schwer meßbar (Zellsuspension) oder sie unterliegt erheblichen, methodisch bedingten Variationen (Gewebestücke), die keine Aussage zulassen.

Zur Erstellung der Luteinzellkultur waren umfangreiche Voruntersuchungen notwendig. Die in der Literatur beschriebenen Verfahren mußten modifiziert werden. Mit der von GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ (1972a, 1972b) angegebenen Methode war es nicht möglich, Luteinzellen zu kultivieren, da mit dem von ihnen benützten Trypsin in den eigenen Versuchen keine Dispergierung des Luteingewebes erreicht werden konnte. Eine andere, sehr einfache Methode zur Isolierung von Luteinzellen mit Collagenase (SIMMONS et al. 1976), erwies sich ebenfalls als nicht brauchbar, weil auch nach der Inkubation noch zu viele Zellklumpen und zu wenig Einzelzellen, die für eine homogene Zellaussaat erforderlich sind, vorhanden waren. Auf diesen Nachteil der Methode von SIMMONS et al. (1976) wurde bereits wiederholt hingewiesen (KOOS und HANSEL 1981, RODGERS und O'SHEA 1982).

Unabhängig vom verwendeten Enzym scheint für eine erfolgreiche Zelldispersierung die Inkubationstemperatur entscheidend zu sein. Im Gegensatz zu der häufig vorgeschlagenen Temperatur von + 37°C (SAYERS et al. 1971, GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ 1972a, 1972b, 1975), konnten in den eigenen Untersuchungen nur bei einer Temperatur von + 35°C vitale Zellen gewonnen werden. Von manchen Autoren wurden noch niedrigere Inkubationstemperaturen (bis zu + 32°C) verwendet (WILKINSON et al. 1976, PATE und CONDON 1982, HIXON und HANSEL 1979, SIMMONS et al. 1976). Es liegt die Vermutung nahe, daß Luteinzellen beim Dispersierungsvorgang sehr temperaturempfindlich sind, da z.B. Zellen des Hypophysenvorderlappens mit der im eigenen Verfahren eingesetzten Enzymkonzentration (Pankreatin 0,25 %) bei + 37°C ohne Schwierigkeiten zu gewinnen sind (BRAUN 1982).

Um die Progesteronsekretion verschiedener Gelbkörper und deren Stimulierbarkeit durch bestimmte Hormone in vitro vergleichen zu können, waren bei der Kultivierung von Luteinzellen vor allem zwei Punkte zu berücksichtigen. Zum einen mußte gewährleistet sein, daß der für die Inkubation gewählte Zeitraum eine ungestörte Progesteronsekretion ermöglicht, d.h. keine Produktionshemmung durch das bereits sezernierte Progesteron vorliegt. Zum anderen sollte nach Zugabe luteotroper Hormone eine dosisabhängige Stimulierbarkeit der Progesteronsekretion erreicht werden, um so eventuelle Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit der jeweiligen Kulturen aufzeigen zu können.

Hinsichtlich der optimalen Inkubationsdauer liegen in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse vor. HIXON und HANSEL (1979) erreichten bereits nach einer zwei- bis vierstündigen Inkubation von Zellsuspensionen das Plateau der Progesteronproduktion. Sie führen dies auf eine Produktionshemmung des Hormons zurück. Nach GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ (1972b) können die Progesteronwerte - in diesem Fall handelte es sich im Gegensatz zu den Untersuchungen von HIXON und HANSEL (1979) aber um die Sekretion von Progesteron - bis zu ca. 10 Stunden kontinuierlich ansteigen.

In den in Kapitel 3.2.6.1. angeführten Voruntersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß auch noch im Zeitraum zwischen 12 und 24 Stunden eine kontinuierliche Sekretion stattfindet, da die Werte nach einer 24-stündigen Inkubation mit LH und hCG in serumfreiem Medium (Abb. 4A-B) in der Regel höher lagen als nach einer 12-stündigen Inkubation. Eine eindeutig dosisabhängige Stimulierbarkeit der Progesteronsekretion durch LH bzw. hCG zeigt sich dabei jedoch nur in serumfreiem Medium. Dieses Ergebnis bestätigt neuere Berichte (PATE und CONDON 1982, ORLY et al. 1980, ERICKSON 1983), wonach Serum hormonelle Interaktionen an der kultivierten Zelle hemmt. In früheren Arbeiten (GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ 1972a, 1972b, 1975) war die Meinung vertreten worden, daß auch in serumhaltigem Medium die Progesteronsekretion dosisabhängig stimuliert werden kann.

Die Luteinzellkultur bietet sich an, Langzeiteffekte bestimmter Hormone, die sich über mehrere Tage hinweg auswirken, zu überprüfen. Trotz der guten Kultivierbarkeit der Zellen (Abb. 5d, S.59),

wurde diese Möglichkeit in der eigenen Arbeit nicht genutzt, vielmehr wurden bereits nach einer 12-stündigen Vorinkubation die jeweiligen Hormone für je 12 Stunden den Kulturen zugefügt. Für die Wahl dieses relativ frühen Stimulationszeitpunktes waren folgende Gründe ausschlaggebend:

Einerseits konnte beobachtet werden, daß Luteinzellen sich zum Teil bereits nach 6 Stunden ausbreiten (Abb. 5a, S. 58) und nach 12 Stunden schon fest dem Gefäßboden anhaften (Abb. 5b, S. 58). Darüberhinaus gibt es aus der Literatur Hinweise dafür, daß sich an der Luteinzelle, falls sie für mehrere Tage kultiviert wird, morphologische (GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ 1975) und ultrastrukturelle Veränderungen (GULYAS und HODGEN 1981) vollziehen, die ihre weitere Brauchbarkeit für endokrinologische Untersuchungen in Frage stellen könnten.

Andererseits sollte die Inkubation so früh wie möglich nach der Aussaat erfolgen, damit die später zu erwartende, eventuell unterschiedliche Zellvermehrung und deren Einfluß auf die Progesteronkonzentration im Medium vermieden wurde (vgl. Abb. 5b, 5c, und 5d, S. 58 und 59).

Die radioimmunologische Progesteronbestimmung in den Kulturmedien wurde ohne vorherige Extraktion durchgeführt, da diese Werte nicht wesentlich von solchen nach Extraktion abweichen (Tab. 4, S. 64). Die gemessenen Progesteronkonzentrationen, d.h. die Absolutwerte, sind nur sehr schwer mit solchen aus der Literatur zu vergleichen, da die Bezugsgrößen, wie Zellmenge, Inkubationszeit und die zur Stimulation verwendeten Hormondosen sehr stark variieren.

Die hier festgestellten Werte für die Progesteronsekretion der Luteinzellkulturen liegen mit ca. 40 bis 250 ng pro 30000 Zellen meist unter den in der Literatur angegebenen Resultaten. Das hängt vermutlich damit zusammen, daß in den eigenen Versuchen der Inkubationszeitpunkt mit 12 Stunden nach der Zellaussaat früher angesetzt wurde, und auch die Inkubationsdauer (12 Stunden) kürzer war als in vergleichbaren Arbeiten (PATE und CONDON 1982). Hinzu kommt, daß die meisten Autoren die hormonelle Inkubation in serumhaltigem Medium durchführten, was - wie sich auch in den eigenen Voruntersuchungen zeigte (Abb. 3A-B, 4A-B) - eine wesentlich höhere, allerdings nicht dosisabhängige, Progesteronsekretion der Zellkulturen zur Folge hat. Die dosisabhängige Stimulierung schien aber für den Vergleich der Sekretionsleistung von Luteinzellen aus Corpora lutea mit und ohne Hohlraumbildung besonders wichtig, weil diese relativen Reaktionen einen Vergleich zwischen verschiedenen Zellaussaaten gestatten.

Das Ziel dieser Arbeit bestand zunächst darin, Luteinzellen kompakter und "zystöser" Gelbkörper aus allen 4 Entwicklungsstadien zu kultivieren. Letztendlich konnten jedoch nur Kulturen aus Gelbkörpern der späten Anbildungsphase und der Blütephase für einen Vergleich herangezogen werden. Die frühe Anbildungsphase konnte nicht untersucht werden, weil in diesem Stadium keine Corpora lutea mit Hohlraumbildung gefunden werden konnten. Die Gelbkörper aus der Regressionsphase mußten wegen der geringen Vitalitätsrate (< 20 %) der Luteinzellen eliminiert werden. Es ist nicht auszuschließen, daß das gewählte Dispergierungsverfahren

für den Aufschluß von Luteingewebe aus Gelbkörpern der Regressionsphase ungeeignet ist. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß solche Gelbkörper bereits in vivo einen hohen Anteil degenerierter Zellen aufweisen und dadurch die Vitalität in vitro reduziert ist. Unterstützt wird diese Ansicht durch Untersuchungen von OKUDA (1982), der anhand histologischer Untersuchungen einen hohen Anteil degenerierter Zellen in Gelbkörpern der Rückbildungsphase nachwies. Für die Annahme, daß diese aus der Regressionsphase stammenden Corpora lutea nicht mehr endokrin aktiv waren, sprechen die allgemein bekannten und auch von OKUDA (1982) festgestellten, niedrigen Progesteronkonzentrationen im Blut dieser Tiere ($< 1 \text{ ng/ml}$).

Für die Aussaat wurden nur solche Zellen verwendet, deren Vitalitätsrate über 75 % lag; dabei schwankten die Werte in einem Bereich zwischen 75,1 und 95,7 %. Der Anteil lebender Luteinzellen aus den durch Ovariectomie gewonnenen Gelbkörpern betrug 75,5 bzw. 86,3 %. Er war im Bereich der aus Schlachthofmaterial gewonnenen Zellsuspensionen. Daher scheinen postmortale Einflüsse, die nach HANSEL (1971) In vitro-Untersuchungen stark beeinträchtigen können, in dem hier verwendeten Material nicht wirksam geworden zu sein.

Auf Grund der variiierenden Vitalitätsraten der Luteinzellen stellte sich zunächst die Frage, ob diese mit einem bestimmten Zyklusstadium oder mit dem Vorliegen einer Hohlraumbildung der Gelbkörper in Zusammenhang stehen. Abgesehen von den erheblich

niedrigeren Vitalitätsraten der Corpora lutea der Regressionsphase unterschieden sich die Gelbkörper aus der späten Anbildungsphase und der Blütephase, die hier näher untersucht wurden, nur unwesentlich (Tab. 7). Ein eindeutiger Einfluß des Entwicklungsstadiums oder der Hohlraumbildung konnte aus diesen Resultaten also nicht abgeleitet werden. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß es sich bei den für die Überprüfung der Progesteronsekretion verwendeten Zellkulturen um ein vorselektiertes Material handelte, weil Corpora lutea mit Vitalitätsraten unter 75 % verworfen wurden.

Nachdem die basale Progesteronsekretion in jeder der 4 Versuchsgruppen, d.h. bei Gelbkörpern der späten Anbildungsphase und der Blütephase, jeweils mit und ohne Hohlraumbildung, stark schwankte (Abb. 8), war es wichtig nachzuprüfen, ob diese Variationen mit den Vitalitätsraten der Luteinzellen zusammenhängen. Die Korrelationen zwischen diesen beiden Parametern waren jedoch nicht signifikant. Die basale Sekretionsleistung der Luteinzellen in vitro scheint demnach nicht von der Vitalität der dispergierten Zellen, sondern von der Leistung der einzelnen Zelle abzuhängen. Das wurde vor allem daraus deutlich, daß zwischen den Entwicklungsstadien Unterschiede in der basalen Progesteronsekretion bestanden. In der Blütephase tendierten sowohl Gelbkörper mit als auch ohne Hohlraumbildung zu einer intensiveren Basalsekretion, der Unterschied zur Anbildungsphase war jedoch nur in der Gruppe "ohne Hohlraumbildung" signifikant ($P \leq 0,05$, t-Test; Tab. 8). Daraus könnte abgeleitet werden, daß Corpora lutea mit Hohlraumbildung

in der Anbildungsphase eine dem kompakten Gelbkörper gleichartige Progesteronbildung aufweisen, dann aber, im Laufe ihrer Entwicklung hinter der sekretorischen Aktivität der kompakten Gelbkörper zurückbleiben.

Die hier beobachtete Zyklusabhängigkeit der endokrinen Leistung von Luteinzellkulturen steht im Gegensatz zu den von ARMSTRONG et al. (1964) bzw. ARMSTRONG und BLACK (1966) publizierten Ergebnissen. Sie geben an, daß sich Gewebestücke von 3 bis 8 und 9 bis 13 Tage alten kompakten Gelbkörpern kaum in der basalen Progesteronproduktion unterscheiden. Die Diskrepanz könnte in diesem Fall methodisch bedingt sein. Die genannten Autoren nahmen die Hormonbestimmungen nicht nur im Medium, sondern auch im Gewebe vor.

Neben der basalen Progesteronsekretion ist zur Beurteilung der Funktionstüchtigkeit von Luteinalgewebe vor allem die Reaktion auf sekretionsfördernde bzw. -hemmende Substanzen von Wichtigkeit. Es bot sich daher an, die insbesondere für LH, hCG sowie PGE_2 bekannte, luteotrope Wirkung an Corpora lutea mit und ohne Hohlraumbildung zu vergleichen. Für die übrigen zugeführten Substanzen (Tab. 3a und 3b, S. 52 und 53), von denen anhand der Literatur z.T. widersprüchliche Wirkungen zu erwarten waren, stellte sich unter anderem die Frage, ob sie, sofern sie auf die Sekretion kompakter Corpora lutea keinen Einfluß haben, eventuell eine Reaktion bei Corpora lutea mit Hohlraumbildung hervorrufen.

Die Hormone wurden z.T. hoch konzentriert zugegeben; um jedoch sicher zu sein, auch den "physiologischen" Bereich abzudecken, wurde jeweils eine 7-stufige, logarithmische Verdünnungsreihe angelegt (Abb. 6, S. 61; Tab. 3a und 3b).

Die Reaktion der Zellkulturen auf die zugefügten Hormone zeigte, daß die sekretorische Aktivität von Corpora lutea von verschiedenen Faktoren abhängig ist.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte, wie auch von anderen Autoren beschrieben (ARMSTRONG und BLACK 1966), nachgewiesen werden, daß die Reaktion des Corpus luteum auf luteotrope Hormone wesentlich von seinem Entwicklungsstadium bestimmt wird. In der Blütephase lagen die Progesteronwerte generell höher als in der späten Anbildungsphase.

Erstmals konnte durch die hier angelegten Untersuchungen in vitro belegt werden, daß sich die Hohlraumbildung negativ auf die hormoninduzierte Sekretionsleistung von Corpora lutea auswirkt. In der überwiegenden Zahl der Fälle zeigten die allgemein niedrigeren Progesteronwerte der Corpora lutea mit Hohlraumbildung eine Signifikanz gegenüber den Vergleichswerten der kompakten Gelbkörper (Tab. 9). Auch in den übrigen Fällen, in denen die Unterschiede vermutlich wegen des kleinen Stichprobenumfanges statistisch nicht abzusichern waren, konnte dieser Trend beobachtet werden (Abb. 9 bis Abb. 16).

Betrachtet man die hier eingesetzten Hormone im einzelnen, so bestätigte sich bei LH, hCG und PGE_2 die bereits vielfach beschriebene luteotrope Wirkung (z.B. HANSEL und SEIFART 1967, GOSPODAROWICZ und GOSPODAROWICZ 1972a, 1972b, PATE und CONDON 1982). Darüberhinaus konnte bei diesen Hormonen mit zunehmender Dosierung eine Tendenz zu ansteigenden Progesteronkonzentrationen in den Luteinzellkulturen festgestellt werden (Abb. 9, 10, 12).

Die mit den übrigen Hormonen erzielten Ergebnisse stimmen z.T. mit den bisherigen Erfahrungen überein, z.T. wurden abweichende Resultate registriert, die möglicherweise auf methodische Unterschiede zurückzuführen sind. Prolaktin (LTH) hatte keinen wesentlichen Einfluß auf die Progesteronsekretion (Abb. 11), was auch der Arbeit von HANSEL und SEIFART (1967) zu entnehmen ist. Auch 17β -Östradiol, Androstendion, $\text{PGF}_{2\alpha}$ und Oxytozin, deren Bedeutung für die Gelbkörperfunktion z.T. noch umstritten ist, zeigten keine signifikante Wirkung auf die Progesteronsekretion.

Ein sekretionshemmender Effekt, wie er für Östradiol (SAUER 1975) beschrieben wurde, konnte nicht festgestellt werden (Abb. 13). Dies entspricht den Beobachtungen von HIXON und HANSEL (1979).

Nachdem WILLIAMS und MARSH (1978a) die progesteronhemmende Wirkung zugefügter Androgene auf die Aromatisierung von Östrogenen zurückführen, schien es für die hier vorliegende Arbeit von Interesse, die Zellkulturen mit Androstendion zu inkubieren. Da

sich weder bei Corpora lutea ohne noch solchen mit Hohlraumbildung eine "luteolytische" Wirkung bemerkbar machte (Abb. 14), ist daraus zu schließen, daß Luteinzellen von Corpora lutea mit Hohlraumbildung keinen von demjenigen kompakter Gelbkörper abweichenden Steroidmetabolismus aufweisen.

Was die Auswirkungen des in der Literatur häufiger beschriebenen $\text{PGF}_{2\alpha}$ anbelangt, konnte in den eigenen Untersuchungen kein Einfluß auf die Progesteronsekretion festgestellt werden (Abb. 15), was mit Untersuchungen mehrerer Autoren (HIXON und HANSEL 1979, KOOS und HANSEL 1981) übereinstimmt.

Ein dem $\text{PGF}_{2\alpha}$ vergleichbares Ergebnis zeigte sich nach der Inkubation der Kulturen mit Oxytozin, wesentliche Einflüsse auf die Progesteronsekretion ergaben sich demnach nicht (Abb. 16).

Daß Corpora lutea mit Hohlraumbildung grundsätzlich zu niedrigeren Werten tendieren, kann nicht unbedingt als Ausdruck einer verminderten Funktionstüchtigkeit interpretiert werden. Das scheint vor allem deshalb nicht möglich zu sein, weil sich zumindest anhand des hier gewählten Verfahrens keine erheblichen Unterschiede zwischen der Progesteronsekretion von Corpora lutea graviditatis und Hohlraumgelbkörpern der Blütephase ergaben. Die Werte der Trächtigkeitsgelbkörper lagen in einigen Fällen sogar noch niedriger (Abb. 17 und 18).

Die in der Literatur oft in Frage gestellte Fähigkeit von Corpora lutea mit Hohlraumbildung, eine Gravidität aufrechterhalten zu können (GRUNERT 1969), scheint auf Grund der hier erzielten Resultate hinsichtlich der Sekretionsleistung in vitro also nicht gerechtfertigt zu sein. Allerdings müßten diese Zusammenhänge an einem größeren Material noch eingehender abgeklärt werden.

In den bisherigen Überlegungen blieb die jeweilige Hohlraumgröße, die anhand des flüssigen Inhaltes gemessen wurde, unberücksichtigt. In der Literatur wird die Definition der sogenannten "Gelbkörper-Zyste" von einem Minstdurchmesser abhängig gemacht, d.h. erst eine bestimmte Hohlraumgröße soll auf einen eventuell pathologischen Funktionszustand hinweisen. Diese Hypothese war Anlaß, die Progesteronsekretion in vitro mit der Größe des Hohlraumes im Corpus luteum zu korrelieren.

In der Blütephase ergab sich eine negative Korrelation ($r = -0,95$; $P \leq 0.05$) zwischen Hohlraumgröße und basaler Progesteronsekretion. Auch in der späten Anbildungsphase war diese Tendenz zu erkennen (Abb. 19); statistisch konnte sie allerdings nicht verifiziert werden. Gemessen an der basalen Progesteronsekretion scheint demnach ein Zusammenhang zwischen Gelbkörperlumen einerseits und einer verminderten Funktionstüchtigkeit andererseits zu bestehen.

Progesteronbestimmungen im Blutserum der jeweiligen Tiere erbrachten keinen Hinweis dafür, daß die Hohlraumbildung einen Ein-

fluß auf die Sekretion in die Peripherie hat, was bereits von OKUDA (1982) festgestellt wurde. Beachtenswert ist in diesem Zusammenhang, daß die Progesteronwerte im Blutserum nur geringfügige, zyklusbedingte Abweichungen zeigten (Tab. 12), während in der Zellkultur eindeutige Sekretionsunterschiede (Abb. 8) zwischen den beiden Entwicklungsstadien bestanden. Einmalige Blutproben scheinen daher, wie bereits SCHÖNDORFER (1981) feststellte, keine Aussagen über die wahre Sekretionsleistung des Corpus luteum zuzulassen.

Werden die in der vorliegenden Arbeit gewählten Kriterien als Maßstab zur Beurteilung der Sekretionsleistung von Corpora lutea herangezogen, so kann aus den Resultaten kein negativer Einfluß der Hohlraumbildung des Corpus luteum auf die basale Progesteronsekretion und die periphere Progesteronkonzentration im Blut abgeleitet werden. Die Gegenüberstellung der Sekretionsleistung von Corpora lutea graviditatis und Corpora lutea periodica mit Hohlräumen ergab ebenfalls keine Hinweise auf Funktionsunterschiede. Wurde jedoch in vitro die sekretorische Potenz der Luteinzellen für Progesteron durch Hormonstimulierung untersucht, zeigte sich bei den Kulturen von Hohlraumgelbkörpern eine geringere Kapazität im Vergleich zur Gruppe "kompakter Gelbkörper". Ob dieser verminderten sekretorischen Stimulierbarkeit der "Corpus luteum-Zysten" eine Bedeutung hinsichtlich der Aufrechterhaltung der Gravidität zukommt, ist auf Grund dieser Ergebnisse nicht zu entscheiden. Sie erklären jedoch die bisher unterschiedlichen Beobachtungen bei Corpora lutea mit Hohlraumbildung und deren Auswirkung auf

die Progesteronkonzentrationen in den einzelnen Kompartements. Weiterhin können die hier gewonnenen Resultate - gleiche Basissekretion der Luteinzellen von Corpora lutea mit und ohne Hohlraumbildung, unterschiedliche Progesteronsekretion nach Stimulierung mit Hormonen sowie gleiche sekretorische Potenz nach Hormonstimulierung bei Corpora lutea periodica mit Hohlraumbildung und Corpora lutea graviditatis - als Basis dienen, um die Bedeutung dieser Lumenbildung für das Reproduktionsgeschehen beim Rind abzuklären.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde überprüft, ob beim Rind Corpora lutea mit und ohne Hohlraumbildung eine unterschiedliche Progesteronsekretion aufweisen.

Für die Untersuchungen wurden 20 Corpora lutea mit und ohne Hohlraumbildung, die der späten Anbildungsphase und der Blütephase zugeordnet worden waren, herangezogen. Zusätzlich wurden 2 Corpora lutea graviditatis (30. und 90. Tag) untersucht. Zwei Corpora lutea ohne Hohlraumbildung wurden durch Ovariectomie gewonnen, der Rest stammte von Schlachttieren. Die Luteinzellen der Gelbkörper wurden kultiviert und ihre Progesteronsekretion mit Hilfe eines Radioimmunoassays bestimmt.

Corpora lutea der Blütephase zeigten eine intensivere basale Progesteronsekretion als Corpora lutea der späten Anbildungsphase. Die Hohlraumbildung hatte keinen Einfluß auf die basale Sekretionsleistung.

Die hormoninduzierte Progesteronsekretion war bei Luteinzellen aus Gelbkörpern mit Hohlraumbildung geringer als bei kompakten Corpora lutea. LH, hCG, Prolaktin, PGE_2 , Androstendion und $\text{PGF}_{2\alpha}$ (alle $P \leq 0,01$ außer $\text{PGF}_{2\alpha}$ mit $P \leq 0,05$) führten zu einem signifikanten Unterschied, wobei Corpora lutea der Blütephase grundsätzlich höhere Werte erreichten als Corpora lutea der späten Anbildungsphase ($P \leq 0,01$). Ein eindeutiger Ef-

fekt der Hormondosis auf die Progesteronsekretion war im Gegensatz zu Prolaktin, Androstendion, 17β -Östradiol, $\text{PGF}_{2\alpha}$ und Oxytozin durch LH, hCG und PGE_2 gegeben ($P \leq 0,01$).

Zwischen der Basalsekretion der Zellkulturen und der Hohlraumgröße des Corpus luteum ergab sich in der Blütephase ($r = - 0,95$; $P \leq 0,05$), nicht aber in der späten Anbildungsphase ($r = - 0,59$; $P > 0,05$) eine deutlich negative Korrelation.

Die basale Progesteronsekretion der Luteinzellen in vitro und die Progesteronkonzentration im peripheren Blut waren nicht korreliert ($r = 0,47$; $P > 0,05$).

Die Ergebnisse zeigen, daß die Hohlraumbildung die basale Progesteronsekretion von Corpora lutea periodica nicht beeinflusst, bei der hormoninduzierten Sekretion hingegen eine verminderte sekretorische Potenz bedingt, die aber keinen Unterschied zur hormoninduzierten Sekretionsleistung von Corpora lutea graviditatis erkennen läßt.

6. SUMMARY

"Luteal cell culture as a model for examining progesterone secretion of corpora lutea and "cystic" corpora lutea in cows"

It was investigated whether corpora lutea with and without cavities show differing progesterone secretion.

Data for this report were collected from twenty corpora lutea (with and without cavities) in the late development and blossom stages of the estrous cycle.

In addition, two corpora lutea of pregnancy (days 30 and 90) were examined. Two corpora lutea were obtained through ovariectomy, the others at slaughter. The luteal cells from the corpora lutea were cultivated and progesterone secretion was determined by radioimmunoassay.

Corpora lutea in the blossom stage showed a more intensive basal progesterone secretion than corpora lutea in the late development stage. The cavities had no influence on basal secretion.

Hormone-induced progesterone secretion was less in luteal cells from corpora lutea with cavities than in solid corpora lutea. Significant differences were found with LH, hCG, prolactin, PGE_2 , androstenedione and $\text{PGF}_{2\alpha}$ (all $P \leq 0.01$ except $\text{PGF}_{2\alpha}$ with $P \leq 0.05$). Whereby, higher values were generally found in

corpora lutea in the blossom stage as compared to corpora lutea in late development ($P \leq 0.01$). The hormone dosage of LH, hCG and PGE_2 clearly effected progesterone secretion as opposed to prolactin, androstenedione, 17 β -estradiol, $PGF_{2\alpha}$ and oxytocin ($P \leq 0.01$).

A definite negative correlation was found between the basal secretion of the cell cultures and the size of the cavity in the corpus luteum in the blossom stage ($r = - 0.95$; $P \leq 0.05$), not however in the stage of late development ($r = - 0.59$; $P > 0.05$).

No correlation was found between the basal progesterone secretion of the luteal cells in vitro and peripheral blood progesterone concentrations ($r = 0.47$; $P > 0.05$).

The results show that cavities do not influence basal progesterone secretion of cycling corpora lutea. In hormone-induced secretion however, the cavities cause a reduction in the secretory potential. But this potential does not differ from that of luteal cells from corpora lutea of pregnancy.

7. LITERATURVERZEICHNIS

AKSEL, S. (1980):

Sporadic and recurrent luteal phase defects in cyclic women:
comparison with normal cycles.

Fert.Steril. 33, 372-377.

AL-DAHASH, S.Y.A. and J.S.E. DAVID (1977):

The incidence of ovarian activity, pregnancy and bovine genital
abnormalities shown by an abattoir survey.

Vet.Rec. 101, 296-299.

ARMSTRONG, D.T. and W. HANSEL (1959):

Alteration of the bovine estrous cycle with oxytocin.

J.Dairy Sci. 42, 553-542.

ARMSTRONG, D.T., D.L. BLACK and C.E. CONE (1964):

Metabolic studies with active and involuting bovine corpora lu-
tea.

Fed.Proc. 23, 462.

ARMSTRONG, D.T. and D.L. BLACK (1966):

Influence of luteinizing hormone on corpus luteum metabolism and
progesterone biosynthesis throughout the bovine estrous cycle.

Endocrinology 78, 937-944.

ARMSTRONG, D.T., T. PING LEE and L.S. MILLER (1970):

Stimulation of progesterone biosynthesis in bovine corpora lutea
by luteinizing hormone in the presence of an inhibitor of chole-
sterol synthesis.

Biol.Reprod. 2, 29-36.

ASDELL, S.A., J. DE ALBA and S.J. ROBERTS (1949):

Studies on the estrous cycle of dairy cattle: cycle length, size of corpus luteum, and endometrial changes.

Cornell Vet. 39, 389-402.

BENESCH, F. and J.G. WRIGHT (1950):

Veterinary obstetrics.

Baillière, Tindall and Cox, London.

BETTENDORF, G. (1974):

Zur Bedeutung der Corpus luteum-Insuffizienz.

Geburtsh.Frauenheilk. 34, 139-140.

BOROWSKI, U. (1972):

Die Häufigkeit von Gelbkörperzysten bei Rindern aus dem Einzugsgebiet des Schlachthofs Delmenhorst.

Vet.med.Diss., Hannover.

BRAUN, U. (1982):

Persönliche Mitteilung.

CONDON, W.A. (1975):

Biochemical and histofluorescence studies of adrenergic and gonadotrophic influences on progesterone production by the bovine corpus luteum.

Diss.Abstr.Int. 36B, 2658.

CONDON, W.A. and D.L. BLACK (1976):

Catecholamine-induced stimulation of progesterone by the bovine corpus luteum in vitro.

Biol.Reprod. 15, 573-578.

CONDON, W.A. and J.L. PATE (1981):

Influence of serum and its lipoprotein fractions on progesterone synthesis and secretion by bovine luteal tissue in vitro.

Biol.Reprod. 25, 950-957.

CONRADI, H. (1943):

Ein Beitrag zur Gelbkörperdiagnose beim Rind.

Dtsch.Tierärztl.Wschr. 51, 224-227.

CUBICK, P. (1972):

Ein Beitrag zur Häufigkeit und Morphologie der Gelbkörperzysten bei Rindern im Einzugsbereich des Schlachthofes Hannover.

Vet.med.Diss., Hannover.

DATTATREYAMURTY, B., P. RATHNAM and B.B. SAXENA (1983):

Isolation of the luteinizing hormone-chorionic gonadotropin receptor in high yield from bovine corpora lutea.

J.biol.Chem. 258, 3140-3158.

DAVIS, J.S., R.V. FARESE and J.M. MARSH (1981):

Stimulation of phospholipid labeling and steroidogenesis by luteinizing hormone in isolated bovine luteal cells.

Endocrinology 109, 469-475.

DAWSON, F.L.M. (1959):

The significance of cystic enlargement in the bovine corpus luteum

Br.vet.J. 115, 46-55.

DAWSON, F.M.L. (1964):

Report on infertility from persistent corpus luteum and cystic degeneration.

Proc.V.Int.Congr.Anim.Reprod.Artif.Insem., Vol. 7, Trento, 374-377.

DAWSON, F.L.M. (1975):

Accuracy of rectal palpation in the diagnosis of ovarian function in the cow.

Vet.Rec. 96, 218-220.

DIETER, D. (1969):

Zum Vorkommen und zur Bedeutung der Gelbkörperzyste beim Rind in neuer Sicht.

Tierärztl.Umschau 24, 216-223.

DONALDSON, L.E. and A. TAKKEN (1968):

The effect of exogenous oxytocin on corpus luteum function in the cow.

J.Reprod.Fert. 17, 373-383.

EHRLICH, J. (1950):

Eierstockskontrolle beim Rind und ihre Bedeutung für die Besamung.

Tierärztl.Umschau 5, 440-444.

ELDER, C. (1925):

Studies of the corpus luteum.

J.Am.Vet.Med.Ass. 67, 349-363.

EMRICH, H. (1958):

Sterilitäts- und Graviditätszustände bei Schlachtrindern am Schlachthof Kaiserslautern/Pfalz.

Vet.med.Diss., München.

ERB, R.E. and F. STORMSHAK (1961):

Progestins in corpora lutea, ovaries, and adrenals after estrus and breeding of normal and abnormal cows.

J.Dairy Sci. 44, 888-896.

ERICKSON, G.F. (1983):

Primary cultures of ovarian cells in serum-free medium as models of hormone-dependent differentiation.

Molec.Cell.Endocr. 29, 21-49.

ERNST, K. (1956):

Morphologische und funktionelle Untersuchungen am Rinderovar.

Vet.med.Diss., München.

FIELDS, P.A., R.K. ELDRIDGE, A.-R. FUCHS, R.F. ROBERTS and M.J.

FIELDS (1983):

Human placental and bovine corpora luteal oxytocin.

Endocrinology 112, 1544-1546.

FLETCHER, P.L. and G.D. NISWENDER (1980):

unpublished data (zit. nach NISWENDER 1981).

FLOEHR, W. (1974):

Quantitative und qualitative Untersuchungen am Ovar zur Beurteilung des zystösen Gelbkörpers beim nichtgraviden Rind.

Vet.med.Diss., Hannover

FOLEY, R.C. and J.S. GREENSTEIN (1958):

Cytological changes in the bovine corpus luteum during early pregnancy.

In: GASSNER, F.X., Symposium on reproduction and infertility, 88-96 (zit. nach OKUDA 1982).

FRIEBE, K.H. (1970):

Ein Beitrag zur Morphologie des Gelbkörpers beim Rind.

Diss., Biowissenschaftl.Fakultät, Humboldt-Univ., Berlin.

FRIEDRICH, F. (1975):

Klinik der Gelbkörperfunktion.

Verlag Wilhelm Maudrich, Wien-München-Bern.

GODKIN, J.D., C. COTE and R.T. DUBY (1978):

Embryonic stimulation of ovine and bovine corpora lutea.

J.Reprod.Fert. 54, 375-378.

GOSPODAROWICZ, D. and F. GOSPODAROWICZ (1972a):

A technique for the isolation of bovine luteal cells and its application to metabolic studies of luteal cells in vitro.

Endocrinology 90, 1427-1434.

GOSPODAROWICZ, D. and F. GOSPODAROWICZ (1972b):

Bovine luteal cells in tissue culture.

Exp.Cell Res. 75, 353-362.

GOSPODAROWICZ, D. and F. GOSPODAROWICZ (1975):

The morphological transformation and inhibition of growth of bovine luteal cells in tissue culture induced by luteinizing hormone and dibutyryl cyclic AMP.

Endocrinology 96, 458-467.

GREENSTEIN, J.S. (1960):

Experimental induction of cystic corpora lutea in Dairy cattle.

Int.J.Fert. 6, 79-88.

GREGORASZCZUK, E. (1983):

Steroid hormone release in cultures of pig corpus luteum and granulosa cells: Effect of LH, hCG, PRL and estradiol.

Endocr.exp.Bratisl. 17, 59-68.

GREGORASZCZUK, E., A. OKOLSKI and J. GALAS (1980):

The direct influence of stallion semen on progesterone production in cultured corpus luteum cells.

Zbl.Vet.Med. A 27, 788-795.

GRUNERT, E. (1969):

Gelbkörperzysten beim Rind und ihre Bedeutung als Sterilitätsfaktor.

Dtsch.Tierärztl.Wschr. 76, 668-672.

GRUNERT, E. (1982):

Ovarielle Dysfunktionen.

In: GRUNERT, E. und M. BERCHTOLD, Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind, 184-185, Verlag Paul Parey.

GULYAS, B.J. and G.D. HODGEN (1981):

In vitro studies on luteolysis in the Rhesus monkey.

In: SCHWARTZ, N.B. and M. HUNZICKER-DUNN, Dynamics of ovarian function, p. 191-196, Raven Press, New York.

HAMMOND, J. (1927):

The physiology of reproduction in the cow.

Cambridge University Press, London.

HANSEL, W. (1959):

Female infertility in domestic animals.

Fert.Steril. 10, 502-512.

HANSEL, W. (1964):

Some observations on bovine cystic corpora lutea.

Proc.V.Int.Congr.Anim.Reprod.Artif.Insem., Vol. 7, Trento, 378-384.

HANSEL, W. (1966):

Luteotrophic and luteolytic mechanisms in bovine corpora lutea.
J.Reprod.Fert. Suppl. 1, 33-48.

HANSEL, W. (1971):

Survival and gonadotrophin responsiveness of luteal cells in vitro.

Acta endocrinol. 153, 295-317.

HANSEL, W. and W.C. WAGNER (1960):

Luteal inhibition in the bovine as a result of oxytocin injections, uterine dilatation, and intrauterine infusions of seminal and preputial fluids.

J.Dairy Sci. 43, 796-805.

HANSEL, W. and K.H. SEIFART (1967):

Maintenance of luteal function in the cow.

J.Dairy Sci. 50, 1948-1958.

HANSEL, W., P.W. CONCANNON and J.H. LUKASZEWSKA (1973):

Corpora lutea of large domestic animals.

Biol.Reprod. 8, 222-245.

HENRICKS, D.M., DICKEY, J.F. and G.D. NISWENDER (1970):

Serum luteinizing hormone and plasma progesterone levels during the estrous cycle and early pregnancy in cows.

Biol.Reprod. 2, 346-351.

HIXON, J.E. and W. HANSEL (1979):

Effects of prostaglandin $F_{2\alpha}$, estradiol and luteinizing hormone in dispersed cell preparations of bovine corpora lutea.

In: CHANNING, C.P., J. MARSH and W.A. SADLER, Ovarian follicular and corpus luteum function, p. 613-619, Plenum Press, New York.

HOFFMANN, B. (1969):

Gaschromatographische Bestimmung von Progesteron in Gewebe von Corpus luteum-Zysten bei Kühen.

Dtsch.Tierärztl.Wschr. 76, 287-289.

HOFFMANN, B. (1972):

Bestimmung von Steroidhormonen beim weiblichen Rind; Entwicklung von Meßverfahren und physiologische Daten.

Vet.med.Habil., München-Weihenstephan.

HORNIG, B. (1978):

Untersuchungen über die Aussagesicherheit der an Ovarien durch rektale Kontrolle erhobenen Befunde beim Rind.

Vet.med.Diss., Hannover.

HORSTMANN, G. (1971):

Histologische und histochemische Untersuchungen an Gelbkörperzysten des Rindes mit einem Vergleich zum kompakten Gelbkörper.

Vet.med.Diss., Hannover.

HORSTMANN, G. und R. SCHWARZ (1973):

Histomorphologische Untersuchungen zur Involution zystöser Gelbkörper des Rindes nach dem 21. Zyklustag.

Anat., Histol., Embryol. 2, 136-146.

HUNTER, M.G. (1981):

Responsiveness in vitro of porcine luteal tissue recovered at two stages of the luteal phase.

J.Reprod.Fert. 63, 471-476.

JORDAN, D. (1969):

Vergleiche zwischen Befunden intra vitam und post mortem an Geschlechtsorganen von Rindern.

Vet.med.Diss., München.

KALTENBACH, C.C. and T.G. DUNN (1980):

Endocrinology of reproduction.

In: HAFEZ, E.S.E., Reproduction in farm animals, 4. Aufl., 85-113, Lea & Febiger, Philadelphia.

KANEDA, Y., I. DOMEKI and T. NAKAHARA (1980):

Effects of removal of cystic fluid from cystic corpus luteum on luteinization and conception rate in dairy heifers.

Jap.J.Anim.Reprod. 26, 37-42.

KARG, H., B. HOFFMANN und D. SCHAMS (1969):

Verlauf der Blutspiegel an Progesteron, Luteinisierungshormon und Prolaktin während des Zyklus bei einer Kuh.

Zuchthyg. 4, 149-153.

KAWAKAMI, S. and T. OCHI (1976):

Bovine luteal cell culture and its susceptibility to gonadotropin in vitro.

Jap.J.Anim.Reprod. 22, 50-54.

KESLER, D.J., P.G. WESTON, C.A. PIMENTEL, T.R. TROXEL, D.L. VINCENT and J.E. HIXON (1981):

Diminution of the in vitro response to luteinizing hormone by corpora lutea induced by gonadotropin releasing hormone treatment of postpartum suckled beef cows.

J.Anim.Sci. 53, 749-754.

KESSANK, P. (1977):

Vergleichende klinische und hormonanalytische Untersuchungen zur Diagnose von ovariellen Funktionsgebilden beim Rind.

Vet.med.Diss., Hannover.

KIMBALL, F.A. and W. HANSEL (1974):

Estrogen cytosol binding proteins in bovine endometrium and corpus luteum.

Biol.Reprod. 11, 566-577.

KOLLMER, A. (1953):

Sterilitäts- und Graviditätszustände bei Schlachtkühen am Schlachthof Bamberg.

Vet.med.Diss., München.

KOOS, R.D. (1978):

Progesterone synthesis by bovine corpus luteum cells separated by unit gravity sedimentation.

Biol.Reprod. 18, Suppl. 1, 78A, 173.

KOOS, R.D. and W. HANSEL (1981):

The large and small cells of the bovine corpus luteum: Ultra-structural and functional differences.

In: SCHWARTZ, N.B. and M. HUNZICKER-DUNN, Dynamics of ovarian function, p. 197-203, Raven Press, New York.

KRUPSKI, A. (1917):

Beiträge zur Physiologie der weiblichen Sexualorgane des Rindes.

Schweiz.Arch.Tierhk. 59, 19-25.

LOBEL, B.L. and E. LEVY (1968):

Enzymic correlates of development, secretory function and regression of follicles and corpora lutea in the bovine ovary.

Acta Endocrinol.(Kbh.)Suppl. 132, 59, 1-63.

MANNS, J.G. and G.D. NISWENDER (1983):

FSH receptors in the bovine corpus luteum.

J.Anim.Sci. 57, Suppl. 1, Abstr. 536.

MASON, N.R. and K. SAVARD (1964):
Specificity of gonadotropin stimulation of progesterone synthesis
in bovine corpus luteum in vitro.
Endocrinology 74, 664-668.

MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK und G. WITTMANN (1974):
Virologische Arbeitsmethoden Band I.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

McENTEE, K. (1958):
Cystic corpora lutea in cattle.
Int.J.Fert. 3, 120-126.

McNUTT, G.W. (1924):
The corpus luteum of the ox ovary in relation to the estrous
cycle.
J.Am.Vet.Med.Ass. 65, 556-597.

MORROW, D.A., L.V. SWANSON and H.D. HAFS (1976):
Estrous behavior and ovarian activity in peripuberal heifers.
Theriogenology 6, 427-435.

MORROW, D.A., S.J. ROBERTS, K. McENTEE and H.G. GRAY (1966):
Postpartum ovarian activity and uterine involution in dairy
cattle.
J.Am.Vet.Med.Ass. 149, 1596-1609.

NISWENDER, G.D. (1981):
Mechanisms controlling luteolysis.
In: SCHWARTZ, N.B. and M. HUNZICKER-DUNN, Dynamics of ovarian
function, p. 153-160, Raven Press, New York.

OKUDA, K. (1982):

Morphologische und endokrinologische Untersuchungen am Corpus luteum periodicum und graviditatis des Rindes.

Vet.med.Diss., München.

ORLY, J., G. SATO and G.F. ERICKSON (1980):

Serum suppresses the expression of hormonally induced functions in cultured granulosa cells.

Cell 20, 817-827.

PAPAIONANNOU, S. and D. GOSPODAROWICZ (1975):

Comparison of the binding of human chorionic gonadotropin to isolated bovine luteal cells and bovine luteal plasma membranes.

Endocrinology 97, 114-124.

PATE, J.L. and W.A. CONDON (1982):

Effects of serum and lipoproteins on steroidogenesis in cultured bovine luteal cells.

Mol.Cell.Endocr. 28, 551-562.

PEKALA, R.F., G.J. GNATEK, R.T. DUBY and J.P. TRITSCHLER (1983):

Interaction of oxytocin and LH on progesterone synthesis by bovine luteal cells.

J.Anim.Sci. 57, Suppl. 1, Abstr. 563.

QUIRK, S.J., D.L. WILLCOX, D.M. PARRY and G.D. THORBURN (1979):

Subcellular location of progesterone in the bovine corpus luteum: A biochemical, morphological and cytochemical investigation.

Biol.Reprod. 20, 1133-1145.

RESENDE, J., F. MEGALE, V.R. DO VALE FILHO and O. DE SOUZA GARCIA (1972):

Prevalence of cystic corpora lutea in slaughtered zebu cows.

Args.Esc.Vet.Minas Gerais 24, 115-117.

RHODES, R.C., R.D. RANDEL and C.R. LONG (1982):

Corpus luteum function in the bovine: In vivo and in vitro evidence for both a seasonal and breedtype effect.

J.Anim.Sci. 55, 159-167.

ROBERTS, S.J. (1956):

Veterinary obstetrics and genital diseases.

Ithaca, N.Y.

RODGERS, R.J. and J.D. O'SHEA (1982):

Purification, morphology and progesterone production and content of three cell types isolated from the corpus luteum of the sheep.

Aust.J.Biol.Sci. 35, 441-455.

ROHLF, F.J. and R.R. SOKAL (1969):

Statistical tables.

Freeman, W.H. and Company, San Francisco.

ROINE, K. (1977):

Observations on genital abnormalities in dairy cows using slaughterhouse material.

Nord.Vet.Med. 29, 188-193.

SAUER, N.G. (1975):

The effects of estrogens and other hormones on progesterone synthesis rate and lipid histochemistry of bovine luteal tissue in vitro.

Diss.Abstr.Int. 36B, 3800.

SAVARD, K. (1973):

The biochemistry of the corpus luteum.

Biol.Reprod. 8, 183-202.

SAVION, N., G.-M. LUI, R. LAHERTY and D. GOSPODAROWICZ (1981):

Factors controlling proliferation and progesterone production by bovine granulosa cells in serum-free medium.

Endocrinology 109, 409-420.

SAWYER, H.R., J.H. ABEL, M.C. McCLELLAN, M. SCHMITZ and G.D. NISWENDER (1979):

Secretory granules and progesterone secretion by ovine corpora lutea in vitro.

Endocrinology 104, 476-487.

SAYERS, G., R. PORTANOVA, R.J. BEALL, S. SEELIG and S. MALAMED (1971):

Techniques for the isolation of cells of the adrenal cortex, the anterior pituitary and the corpus luteum: Morphological and functional evaluation of the isolated cells.

Acta endocrinol. 153, 11-26.

SCHAMS, D., E. SCHALLENBERGER, D.L. WALTERS und B. BULLERMANN (1983):

Ovarielle und hypophysäre Oxytocinsekretion beim Rind.

Zuchthyg. 18, 118-119.

SCHALLENBERGER, E., J. RAMPP and D.L. WALTERS (1983):

Pulsatile progesterone secretion occurs during midgestation in the cow even though pulsatile LH secretion is abolished.

J.Anim.Sci. 57, Suppl. 1, 371.

SCHÜNDORFER, A.M. (1982):

Untersuchungen über den Einfluß pulsatiler Gonadotropinfreisetzungen auf die Progesteronsekretion beim Rind.

Vet.med.Diss., München.

SHEMESH, M., W. HANSEL and P.W. CONCANNON (1975):

Testosterone synthesis in the bovine corpus luteum.

Biol.Reprod. 13, 490-493.

SHODELL, M. and H. RUBIN (1970):

Studies on the nature of serum stimulation of proliferation in cell culture.

In vitro 6, 66-74.

SIMMONS, K.R. and W. HANSEL (1961):

Nature of the luteotropic hormone in the bovine.

J.Anim.Sci. 23, 136-141.

SIMMONS, K.R., J.L. CAFFREY, J.L. PHILLIPS, J.H. ABEL and G.D. NISWENDER (1976):

A simple method for preparing suspensions of luteal cells.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 152, 366-371.

SOTO, S.M. DE LA LUZ et J. LEGAULT DEMARE (1960):

Etude de l'activité biologique in vitro des hormones gonadotropes.

I. Production de stéroïdes par l'ovaire de rat sous l'action de l'hormone sérique de jument gravide (PMS).

Acta endocr. (Kbh.) 33, 444-450.

SPICER, L.J., J.J. IRELAND and J.F. ROCHE (1981):

Changes in serum LH, progesterone and specific binding of ^{125}J -hCG to luteal cells during regression and development of bovine corpora lutea.

Biol.Reprod. 25, 832-841.

STABENFELDT, G.H., L.L. EWING and L.E. McDONALD (1969):
Peripheral plasma progesterone levels during the bovine oestrous
cycle.

J.Reprod.Fert. 19, 433-442.

TAN, G.J.S., R. TWEEDALE and J.S.G. BIGGS (1981):
Evidence for a direct effect of oxytocin on the bovine corpora
lutea of early pregnancy.

J.Steroid.Biochem. 14, 32.

THEISSEN, P. (1970):
Physiologische und pathologische Ovarialbefunde an Schlachtorga-
nen des Rindes.

Vet.med.Diss., Hannover.

THWAITES, C.J. and T.N. EDEY (1970):
Histology of the corpus luteum in the ewe: changes during the
estrous cycle and early pregnancy, and in response to some
experimental treatments.

Am.J.Anat. 129, 439-448 (zit. nach OKUDA 1982).

ÜBERSCHÄR, S. (1961):
Zur makroskopischen und mikroskopischen Altersbestimmung am
Corpus luteum des Rindes.

Vet.med.Diss. Hannover.

URSELY, J., J.-M. DARBON and P. LEYMARIE (1981):
Aromatization of testosterone in large and small bovine luteal
cells. Conflicting results between radioimmunoassay and cocry-
STALLIZATION data.

Steroids 38, 271-279.

WEBER, E. (1972):

Grundriß der biologischen Statistik.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

WESTON, P.G. and J.E. HIXON (1980):

Effects of in vivo prostaglandin $F_{2\alpha}$ administration on in vitro progesterone synthesis by bovine corpora lutea.

Biol.Reprod. 22, 259-268.

WILKINSON, R.F., E. ANDERSON and J. AALBERG (1976):

Cytological observations of dissociated rat corpus luteum.

J.Ultrastruct.Res. 57, 168-184.

WILLCOX, D.L. and G.D. THORBURN (1981):

Progesterone binding protein in the bovine corpus luteum.

J.Steroid.Biochem. 14, 841-850.

WILLCOX, D.L. and M.R. ALISON (1982):

Release of protein which binds progesterone from the bovine corpus luteum.

J.Endocr. 92, 51-61.

WILLIAMS, W.L. (1921):

The diseases of the genital organs of domestic animals.

Ithaca, N.Y.

WILLIAMS, M.T. and J.M. MARSH (1978a):

Estradiol inhibition of luteinizing hormone-stimulated progesterone synthesis in isolated bovine luteal cells.

Endocrinology 103, 1611-1618.

WILLIAMS, M.T. and J.M. MARSH (1978b):

Inhibition of LH stimulated progesterone synthesis in isolated bovine luteal cells by cytochalasin B.

Fed.Proc. 37, 1599.

WILLIAMS, W.W. (1964):

Cystic and retained corpora lutea of cattle.

Proc.V.Int.Congr.Anim.Reprod.Artif.Insem., Vol. 7, Trento, 387-390.

WISE, T.H., D. CATON, W.W. THATCHER, A. RAMI LEHRER and M.J. FIELDS (1982):

Androstendione, dehydroepiandrosterone and testosterone in ovarian vein plasma and androstenedione in peripheral arterial plasma during the bovine oestrous cycle.

J.Reprod.Fert. 66, 513-518.

LEBENS LAUF

Am 14.12.1955 wurde ich als drittes Kind des Landwirtes Ernst Stock und seiner Ehefrau Lydia, geb. Kümmerer, in Schwäbisch Hall geboren.

Von 1961 - 1965 besuchte ich die Volksschule in Ilshofen und wechselte danach auf das Mädchengymnasium in Schwäbisch Hall über, das ich 1974 mit der Reifeprüfung abschloß.

Im Wintersemester 1975/76 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Seit Abschluß des Staatsexamens 1981 bin ich mit der Anfertigung vorliegender Arbeit beschäftigt.

Herrn Professor Dr. W. Leidl möchte ich meinen allerherzlichsten Dank für die Überlassung des Themas sowie für die jederzeit gewährte, großzügige Unterstützung aussprechen.

Insbesondere dankbar bin ich Herrn Dr. R. Stolla für die wertvollen Ratschläge bei der Zusammenstellung der Arbeit sowie Herrn Dr. U. Braun für die Einführung in die Arbeiten des Zellabors.

Ferner gilt mein Dank allen Angehörigen des Lehrstuhls, vor allem Fräulein E. Schorer, Frau B. Schüssler und Frau M. Kraus für die hilfreiche Unterstützung bei technischen Arbeiten und der Anfertigung des Manuskriptes.

Nicht zuletzt möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Professor Dr. H. Karg und seinen Mitarbeitern Dr. E. Schallenberger und Dr. H. Meyer - Institut für Physiologie der Technischen Universität München/Weihenstephan - für die Möglichkeit, mich in die Methodik des Radioimmunoassays einzuarbeiten, bedanken.

